



This is a digital copy of a book that was preserved for generations on library shelves before it was carefully scanned by Google as part of a project to make the world's books discoverable online.

It has survived long enough for the copyright to expire and the book to enter the public domain. A public domain book is one that was never subject to copyright or whose legal copyright term has expired. Whether a book is in the public domain may vary country to country. Public domain books are our gateways to the past, representing a wealth of history, culture and knowledge that's often difficult to discover.

Marks, notations and other marginalia present in the original volume will appear in this file - a reminder of this book's long journey from the publisher to a library and finally to you.

### Usage guidelines

Google is proud to partner with libraries to digitize public domain materials and make them widely accessible. Public domain books belong to the public and we are merely their custodians. Nevertheless, this work is expensive, so in order to keep providing this resource, we have taken steps to prevent abuse by commercial parties, including placing technical restrictions on automated querying.

We also ask that you:

- + *Make non-commercial use of the files* We designed Google Book Search for use by individuals, and we request that you use these files for personal, non-commercial purposes.
- + *Refrain from automated querying* Do not send automated queries of any sort to Google's system: If you are conducting research on machine translation, optical character recognition or other areas where access to a large amount of text is helpful, please contact us. We encourage the use of public domain materials for these purposes and may be able to help.
- + *Maintain attribution* The Google "watermark" you see on each file is essential for informing people about this project and helping them find additional materials through Google Book Search. Please do not remove it.
- + *Keep it legal* Whatever your use, remember that you are responsible for ensuring that what you are doing is legal. Do not assume that just because we believe a book is in the public domain for users in the United States, that the work is also in the public domain for users in other countries. Whether a book is still in copyright varies from country to country, and we can't offer guidance on whether any specific use of any specific book is allowed. Please do not assume that a book's appearance in Google Book Search means it can be used in any manner anywhere in the world. Copyright infringement liability can be quite severe.

### About Google Book Search

Google's mission is to organize the world's information and to make it universally accessible and useful. Google Book Search helps readers discover the world's books while helping authors and publishers reach new audiences. You can search through the full text of this book on the web at <http://books.google.com/>

UC-NRLF



B 3 481 483





THE LIBRARY  
OF  
THE UNIVERSITY  
OF CALIFORNIA

EMIL FISCHER COLLECTION

PRESENTED BY HIS SON

Prof. Hermann Fischer

Basel

Rt: 1. 1. 1900.





# HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

## PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. G. v. BUNGE in Basel, Prof. EMIL FISCHER in Berlin, Prof. O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. F. HOFMEISTER in Strassburg, Prof. G. HOPPE-SEYLER in Kiel, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof. HUPPERT in Prag, Prof. JAFFÉ in Königsberg, Prof. E. LUDWIG in Wien, Prof. NENCKI in St. Petersburg, Prof. C. A. PEKELHARING in Utrecht, Prof. E. SALKOWSKI in Berlin, Prof. E. SCHULZE in Zürich und Prof. H. THIERFELDER in Berlin

herausgegeben von

**A. KOSSEL,**

Professor der Physiologie in Marburg.

---

**EINUNDDREISSIGSTER BAND.**

---

Mit einer Abbildung im Text und einer lithographischen Tafel.

---

STRASSBURG  
VERLAG VON KARL J. TRÜBNER  
1900/1901.

**Chemistry Lib.**

QP 501  
H7

# Inhalt des einunddreissigsten Bandes.

✓ 21-11  
CHEMISTRY  
~~LIBRARY~~  
Seite BIOCHEM.  
LIBRARY

## HEFT I und II.

(Ausgegeben am 27. November 1900.)

<b>His d. J., W., und Theodor Paul.</b> Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Verhalten der Harnsäure und ihrer Salze in Lösungen. I. Abhandlung. Mit einer Abbildung . .	1
<b>Malfatti, H.</b> Beitrag zur Kenntniss der peptischen Verdauung . .	43
<b>Langstein, Leo.</b> Die Kohlehydratgruppe des krystallisirten Ovalbumins . . . . .	49
<b>Maszewski, T.</b> Ueber einige Bedingungen der Ptyalinwirkung . .	58
<b>His d. J., W., und Theodor Paul.</b> Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Verhalten der Harnsäure und ihrer Salze in Lösungen. II. Abhandlung . . . . .	64
<b>Weis, Fr.</b> Ueber das proteolytische und ein eiweisscoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz) . . . . .	79
<b>Gregor, Adalbert.</b> Beiträge zur Physiologie des Kreatinins. Erste Mittheilung . . . . .	98
<b>Jochem, Emil.</b> Ein einfaches Verfahren zur Ueberführung der Amidofettsäuren in die entsprechenden Monochlorfettsäuren .	119
<b>Fald, E., und K. Spiro.</b> Ueber die labende und labhemmende Wirkung des Blutes . . . . .	132
<b>Ascoli, Alberto.</b> Ueber den Phosphor der Nucleinstoffe . . . .	156
— — Ueber ein neues Spaltungsproduct des Hefenucleins . . .	161
<b>Kossel, A., und Fr. Kutscher.</b> Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper . . . . .	165
<b>Kutscher, Fr.</b> Ueber die Verwendung der Phosphorwolframsäure bei quantitativen Bestimmungen der Spaltungsprodukte des Eiweisses. . . . .	215

## HEFT III und IV.

(Ausgegeben am 31. Dezember 1900.)

<b>Slowtsoff, B.</b> Zur Kenntniss der pflanzlichen Oxydasen. . . .	227
<b>Pick, E. P., und K. Spiro.</b> Ueber gerinnungshemmende Agentien im Organismus höherer Wirbelthiere . . . . .	235
<b>Ransom, F.</b> Die Injection von Tetanustoxin bezw. Antitoxin in den subarachnoidalen Raum . . . . .	282
<b>Salkowski, E.</b> Ueber das «Invertin» der Hefe . . . . .	305
— — Ueber die eiweissfällende Wirkung des Chloroforms. . . .	329
<b>Fürth, Otto von.</b> Ueber die Eiweisskörper der Kaltblütermuskeln und ihre Beziehung zur Wärmestarre . . . . .	338
— — Ueber den Stoffwechsel der Cephalopoden. . . . .	353
<b>Braunstein, A.</b> Ueber die Harnstoffbestimmung im Harn. . . .	381
<b>Jelles, A.</b> Notiz über Glycocol. . . . .	389
<b>Gulewitsch, Wl.</b> Berichtigung . . . . .	394

M643303



# HEFT V und VI.

(Ausgegeben am 21. Februar 1901.)

Seite

<b>Levene, P. A.</b> Zur Chemie der Mucine . . . . .	395
<b>Bang, Ivar.</b> Erwiderung . . . . .	407
<b>Kossel, A.</b> Bemerkungen zu der Erwiderung des Herrn Bang . .	410
<b>Bang, Ivar.</b> Chemische und physiologische Studien über die Guanyl- säure. I. Theil: Chemische Studien . . . . .	411
<b>Kossel, A.</b> Zur Abwehr . . . . .	428
<b>Rostoski, O.</b> Ueber die Steigerung des Eiweisszerfalls durch Proto- plasmagifte, speciell Chloroformwasser, beim Pflanzenfresser .	432
<b>Zumbusch, Leo R. v.</b> Ueber das Bilifuscin . . . . .	446
<b>Schwarz, L.</b> Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden.	460
<b>Köhler, A.</b> Beiträge zur Kenntniss der elementaren Zusammen- setzung und Verbrennungswärme der Muskelsubstanz ver- schiedener Thiere . . . . .	479
<b>Pröscher, F.</b> Zur Kenntniss der Ehrlich'schen Dimethylamido- benzaldehydreaction Mit einer lithogr. Tafel . . . . .	520
<b>Kurajeff, D.</b> Ueber das Jodprodukt des Oxyhämoglobins . . . .	527
<b>Levene, P. A., und C. Alsberg.</b> Zur Chemie der Paranucleinsäure .	543
<b>Krüger, Martin, und Julius Schmid.</b> Die Bestimmung des Amido- säurenstickstoffs im Harne . . . . .	556
<b>Neuberg, Carl.</b> Ueber die Farbenreactionen von Zuckern . . . .	564
— — Ueber den Nachweis der Bernsteinsäure . . . . .	574

# **Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Verhalten der Harnsäure und ihrer Salze in Lösungen.**

Von

**Dr. Wilhelm His jun.,** a. o. Professor an der Universität Leipzig  
und

**Dr. Theodor Paul,** a. o. Professor an der Universität Tübingen.

**Mit einer Abbildung.**

---

(Der Redaction zugegangen am 15. August 1900.)

---

## **1. Abhandlung: Die Löslichkeit der Harnsäure und ihre elektrolytische Dissociation in reinem Wasser.**

(Inhaltsübersicht: Zweck und Ziele dieser Untersuchungen. — Allgemeines über die Dissociations- und Löslichkeitsverhältnisse der Harnsäure in wässriger Lösung. — Aeltere Löslichkeitsbestimmungen. — Unsere Löslichkeitsversuche. — Versuchsanordnung. — Herstellung reinen Wassers. — Versuchsergebnisse. — Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit wässriger Harnsäurelösungen. — Versuchsanordnung. — Versuchsergebnisse. — Berechnung der Affinitätsconstante der Harnsäure. — Zersetzung der Harnsäure in wässriger Lösung. — Schlussfolgerungen.)

### **1. Zweck und Ziele dieser Untersuchungen.**

Die Chemie der Harnsäure ist seit ihrer Entdeckung durch Karl Wilhelm Scheele im Jahre 1776 Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Durch die ungemein erfolgreichen Arbeiten Emil Fischer's<sup>1)</sup> hat dieselbe eine so gewaltige Förderung erfahren, dass dieser Körper gegenwärtig mit zu den bestgekannten Verbindungen gehört. Wie zu erwarten war, sind diese Errungenschaften für die Physiologie des Stoffwechsels von grossem Nutzen gewesen und haben im hohen Grade anregend auf das Studium der Synthese der Harnsäure und ihrer Abkömmlinge im Thierkörper gewirkt. Im

---

<sup>1)</sup> Emil Fischer, Synthesen in der Puringruppe. Berichte d. deutsch. chem. Gesellschaft 32, 435 (1899).

Gegensatz zu diesen Fortschritten ist das physikalisch-chemische Verhalten der Harnsäure und ihrer Salze verhältnissmässig wenig bearbeitet worden und bis in die neueste Zeit hat man sich im Allgemeinen mit den Beobachtungen begnügt, die Wöhler und Liebig und deren Schüler bei ihren Untersuchungen über das chemische Verhalten gemacht haben und welche von späteren Forschern nur ungenügend ergänzt worden sind. Dieser Umstand ist vielleicht auf die vielfach verbreitete Ansicht zurückzuführen, dass das physikalisch-chemische Verhalten eines Körpers und seiner Verbindungen ohne Weiteres gegeben sei, wenn seine chemische Zusammensetzung mit Sicherheit bekannt ist. Diese Ansicht beruht aber auf einem Irrthum. Durch die Aufklärung der chemischen Constitution der Harnsäure sind wir noch nicht in der Lage, Näheres über ihr Verhalten zu Säuren, Basen, Salzen und anderen Körpern und über die dabei auftretenden Gleichgewichte auszusagen. Diese Gleichgewichte sind aber von grösster Bedeutung, wenn es sich darum handelt, die Bedingungen festzustellen, unter denen z. B. die Harnsäure in den Körperflüssigkeiten als solche oder in der Form von Salzen zur Abscheidung gelangt oder gelöst bleibt. Während uns also die organische Chemie darüber aufklärt, wie die Harnsäure im Organismus gebildet und in andere Körper verwandelt wird, gibt die physikalische Chemie darüber Auskunft, wie sich die gebildete Harnsäure im Körper verhält. Zur Beantwortung der für die Physiologie und Therapie gleich wichtigen Frage: Welche Rolle spielt die Harnsäure im thierischen Körper? ist demnach das Studium beider Arten chemischer Forschung nöthig.

Durch die Fortschritte der physikalischen Chemie in der neueren Zeit ist unsere Kenntniss der Stoffe im gelösten Zustande in vollkommen neue Bahnen gelenkt worden. Die Arbeiten van't Hoff's, Ostwald's, Arrhenius', Nernst's und Anderer haben uns nicht nur die Gesetzmässigkeiten solcher Lösungen kennen gelehrt, welche nur einen Stoff enthalten, sondern uns auch die Mittel und Wege an die Hand gegeben, die Gleichgewichte in Lösungen zu bestimmen, welche zwei und mehr Körper gleichzeitig enthalten. Es lag daher nahe, diese modernen Hilfsmittel auf das Studium der Harnsäure



anzuwenden, wenn auch gewisse Eigenschaften derselben wie z. B. die ausserordentliche Schwerlöslichkeit in Wasser, der Charakter als mehrbasische Säure, das Auftreten colloider Lösungen und die damit verbundenen Uebersättigungserscheinungen schon in rein wässerigen Lösungen grosse Schwierigkeiten bei den theoretischen Betrachtungen und bei der experimentellen Durchführung voraussehen liessen. Andererseits sind wir aber überzeugt, dass die zahllosen Widersprüche, denen man in der physiologisch-chemischen Litteratur über das Verhalten der Harnsäure und ihrer Salze begegnet, zur Zeit nur mit Hilfe der modernen physikalisch-chemischen Methoden beseitigt werden können, und dass eine auf diesen Grundlagen exact durchgeführte Experimentaluntersuchung auch zur Lösung anderer wichtiger physiologisch-chemischer Fragen, wie z. B. der Acidität des Magensaftes, der Alkalescentz des Blutes u. s. w., beitragen wird. In der vorliegenden Arbeit haben wir uns zunächst nur auf das Verhalten der Harnsäure in wässriger Lösung beschränkt und uns bemüht, die physikalisch-chemischen Constanten mit möglichster Sorgfalt festzustellen, da diese für die weiteren Betrachtungen von grundlegender Bedeutung sind. Es sei gleich an dieser Stelle bemerkt, dass wir uns nicht damit begnügt haben, ein Präparat zu untersuchen, sondern drei Präparate verschiedener Provenienz benutzten. Dieser Umstand kommt bei den Löslichkeitsversuchen und der Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit der wässerigen Lösungen besonders in Betracht, da in diesem Falle auch sehr geringe Verunreinigungen, die bei anderen Untersuchungen ohne jeden Einfluss sind, bedeutende Fehler zur Folge haben.

Es kamen folgende Präparate zur Verwendung:

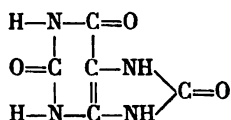
1. Reine Harnsäure von E. Merck. Weisses Pulver mit einem Stich ins Grünliche, gleichmässig in rhombischen Täfelchen krystallisirt. Mit geringem, aber nicht wägbaren Rückstand verbrennlich.

2. Reine Harnsäure von C. A. F. Kahlbaum. Weisses krystallinisches Pulver mit einem Stich ins Gelbliche. Ohne wägbaren Rückstand verbrennlich.

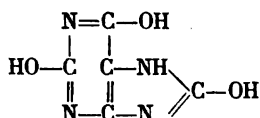
3. Präparat eigener Darstellung. Primäres harnsaureres

Kalium wurde mit Salzsäure zersetzt, die ausgeschiedene Harnsäure nach dem Auswaschen in wässriger Lithiumcarbonatlösung gelöst und durch Salzsäure wiederum gefällt. Blendend weisses Krystallpulver. Ohne jeden Rückstand verbrennlich.

Der Harnsäure von der empirischen Zusammensetzung  $C_5H_4N_4O_3$  gab Medicus die Constitutionsformel:



welche auch nach Emil Fischer's<sup>1)</sup> Auffassung der beste Ausdruck für ihr chemisches Verhalten ist. Mit dieser Formel gleichberechtigt hält Emil Fischer die tautomere Form:



Nach ihm «existiren möglicher Weise sogar beide tautomere Formen; denn es ist bekannt, dass die aus den Salzen in der Kälte in Freiheit gesetzte, amorphe Säure etwas andere Eigenschaften besitzt, als die beim Kochen oder bei längerem Stehen gebildete krystallinische Form». <sup>2)</sup> Weder aus der einen noch anderen Formel lässt sich mit Sicherheit ersehen, wieviellbasisch die Harnsäure ist. Im Allgemeinen verhält sie sich wie eine schwache zweibasische Säure, deren secundäre Alkali- und Erdalkalisalze in wässriger Lösung stark hydrolytisch gespalten sind. Welche Wasserstoffatome bei der elektrolytischen Dissociation der Säure abgespalten werden bez. welche Constitutionsformel die Ionen der Salze haben, lässt sich zur Zeit nicht feststellen. Die Beantwortung der Frage, ob die Harnsäure in stark alkalischer Lösung auch drei- oder sogar vierwerthige Anionen zu bilden vermag d. h. als drei- bez. vierbasische Säure zu functioniren im Stande ist, soll späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

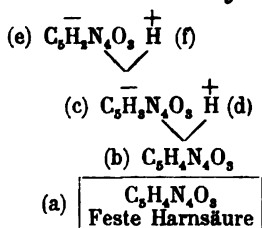
<sup>1)</sup> l. c. S. 447.

<sup>2)</sup> Vergleiche hiermit die auf Seite 6 vorliegender Abhandlung stehenden Angaben über den Einfluss der physikalischen Beschaffenheit der Stoffe auf ihre Löslichkeit.

## 2. Allgemeines über die Dissociations- und Löslichkeitsverhältnisse der Harnsäure in wässriger Lösung.

In folgenden Betrachtungen wollen wir die Annahme machen, dass die Harnsäure zweibasisch sei. Schüttelt man Harnsäure mit reinem Wasser, bis eine gesättigte Lösung entstanden ist, so lässt sich die Constitution dieser Aufschwemmung durch folgendes Schema ausdrücken:

*Schema für die stufenweise elektrolitische Dissociation der Harnsäure in wässriger Lösung.*



In diesem Schema bedeutet:

- (a) Die am Boden liegende feste Harnsäure.<sup>1)</sup>
- (b) Die gelösten nichtdissociierten Harnsäuremolekeln.
- (c) Die negativen primären Harnsäure-Ionen.
- (d) Die auf der ersten Dissociationsstufe gebildeten positiven Wasserstoff-Ionen.
- (e) Die negativen, secundären Harnsäure-Ionen.
- (f) Die auf der zweiten Dissociationsstufe gebildeten positiven Wasserstoff-Ionen.

Wie alle Säuren gehört die Harnsäure zu denjenigen Elektrolyten, welche in wässriger Lösung Wasserstoff-Ionen abspalten und, da sie eine zweibasische Säure ist, können zwei Atome Wasserstoff nacheinander in den Ionenzustand übergehen. Die elektrolitische Dissociation der in Lösung befindlichen Harnsäuremolekeln  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_6$  (b) geht demnach stufenweise in der Weise vor sich, dass zunächst negative primäre Harnsäure-Ionen ( $\text{C}_5\text{H}_3\text{N}_4\text{O}_6$ -Ionen) (c) und positive Wasserstoff-Ionen (H-Ionen) (d) gebildet werden und dass in zweiter Linie aus diesen negativen primären Harnsäure-Ionen (c)

<sup>1)</sup> *Feste Körper*, wie die am Boden der Lösung liegende feste Harnsäure, welche am chemischen Gleichgewicht in der Lösung nicht mit ihrer ganzen Masse Theil nehmen, bezeichnet man in der physikalischen Chemie allgemein als *„Bodenkörper“*. Auch hier soll diese Bezeichnung gebraucht werden.



negative secundäre Harnsäure-Ionen ( $C_5H_2N_4O_3$ -Ionen) (e) und wiederum positive Wasserstoff-Ionen (f) entstehen. Die Bildung secundärer Säure-Ionen ist bei schwachen zweibasischen Säuren in rein wässriger Lösung nur äusserst gering, sie findet in erheblicher Weise nur bei Gegenwart starker Basen statt und kann für die folgenden Betrachtungen vollkommen vernachlässigt werden.

Die Concentration der Stoffe b, c, d, e und f in der Lösung wird durch bestimmte Gleichgewichte geregelt. Zwischen der am Boden liegenden festen Harnsäure a und der nicht dissociirten Säure b besteht insofern ein Gleichgewicht, als die Concentration der letzteren bei einer bestimmten Temperatur ein gewisses Maximum (Löslichkeitsmaximum) nicht überschreiten kann. Nach den Gesetzen der Löslichkeit ist hierbei die Menge der festen Säure ohne Einfluss; für den bestehenden Gleichgewichtszustand genügt es, dass überhaupt feste Säure anwesend ist. Dagegen ist ihre physikalische Beschaffenheit von grösstem Einfluss. Die Löslichkeit einer Substanz kann ganz verschieden sein, je nachdem der feste Bodenkörper krystallinisch oder amorph, wasserfrei oder krystallwasserhaltig ist. Den verschiedenen Hydraten kommt ebenfalls eine verschiedene Löslichkeit zu.<sup>1)</sup> Ja, auch wenn dieselbe Krystallform vorliegt, kann die Löslichkeit verschiedene Werthe annehmen, da im Allgemeinen kleine Krystalle leichter löslich sind als grosse. Für die Bestimmung der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser ist eine genaue Kenntniss dieser Verhältnisse sehr wichtig. Besonders zwischen der Löslichkeit amorpher und krystallinischer Stoffe besteht ein grosser Unterschied. Amorphen Körpern kommt überhaupt keine bestimmte Löslichkeit zu, wenn sie sogenannte colloide Lösungen bilden. Doch wenn dies auch nicht der Fall ist, ist ihre Löslichkeit immer bedeutend grösser, als die der entsprechenden krystallinischen Verbindungen. Die Harnsäure neigt im Allgemeinen nicht dazu, amorph aufzutreten, denn die frisch gefällte Harnsäure zeigt bei der mikroskopischen Untersuchung fast ausnahmslos sogleich die charak-

<sup>1)</sup> Vergl. W. Ostwald, Die wissenschaftlichen Grundlagen der analytischen Chemie, 2. Aufl., Leipzig 1897, Seite 22 u. 41.

teristischen Krystallformen. Unter gewissen Umständen, wobei die Anwesenheit anderer organischer Stoffe einen Einfluss zu haben scheint, wurde aber auch das Auftreten amorpher Formen beobachtet. Ferner ist die Bildung eines krystallisirten Hydrates  $C_5N_4H_4O_3 + 2H_2O$  früher einmal behauptet worden.<sup>1)</sup> Für unsere Zwecke kommt fast ausschliesslich die Löslichkeit der krystallinischen Harnsäure in Betracht, da nur diese die bei Berührung mit Wasser beständige Form darstellt. Die amorphe Säure muss im Laufe der Zeit unter allen Umständen in die krystallinische Form übergehen. Die Möglichkeit ihres vorübergehenden Auftretens und die dadurch hervorgerufenen Uebersättigungserscheinungen sind aber bei Beurtheilung der thatsächlichen Verhältnisse stets in Betracht zu ziehen.

Das Gleichgewicht zwischen den nicht dissociirten Harnsäuremolekeln einerseits und den primären Harnsäure-Ionen und Wasserstoff-Ionen andererseits wird durch die Ostwald'sche Gleichung geregelt:

$$c \cdot d = b \cdot k,$$

wo  $b$  die Concentration der nicht dissociirten Harnsäure, d. h. die Anzahl der in der Volumeinheit enthaltenen Molekeln ist,  $c$  und  $d$  diejenigen der primären Harnsäure-Ionen und Wasserstoff-Ionen sind.  $k$  bedeutet eine Constante, die nach W. Ostwald so genannte Affinitätsgrösse, Affinitäts- oder Dissociationsconstante,<sup>2)</sup> welche für jede Säure specifisch ist und im Allgemeinen einen von der Concentration der wässerigen Lösung und der Anwesenheit anderer Säuren unabhängigen Werth besitzt. Diese Affinitätsconstante wurde von W. Ostwald für eine grosse Reihe von Säuren<sup>3)</sup> experimentell bestimmt — für die Harnsäure wurde sie bisher noch nicht ermittelt —, da sie für das Verhalten und die Reactionsfähigkeit der Säuren von grösster Wichtigkeit ist. Auch die Auflösung schwer löslicher Säuren in Basen und die Ausfällung derselben aus ihren Salzen

<sup>1)</sup> Fritzsche, Journal für prakt. Chemie 17, 56 und Annalen der Pharmacie 32, 315 (1839).

<sup>2)</sup> W. Ostwald, Zeitschrift für physikalische Chemie 3, 170 (1889).

<sup>3)</sup> Ibid.

mittelst stärkerer Säuren werden durch diese Grösse geregelt. Die secundäre Dissociation der Harnsäure, d. h. der Zerfall der primären Harnsäure-Ionen (c) in secundäre Harnsäure-Ionen (e) und Wasserstoff-Ionen, ist wegen der Concentration der bereits vorhandenen, bei der primären Dissociation entstandenen Wasserstoff-Ionen im vorliegenden Falle so gering, dass sie, wie schon oben bemerkt wurde, vernachlässigt werden kann. Für diesen secundären Dissociationsvorgang besteht aber eine dem primären ganz analoge Dissociationsgleichung, nur ist die entsprechende Dissociationsconstante, wie bei allen zweibasischen Säuren, bedeutend kleiner als bei der primären Dissociation. Der Hinweis auf das Bestehen dieser Dissociationsgleichung ist aber deshalb von Bedeutung, weil sie für die Neutralisationsvorgänge der Harnsäure von entscheidender Wichtigkeit ist. In diesem Falle wird die Concentration der Wasserstoff-Ionen sehr gering und die Folge davon ist, dass, da die Gleichung unter allen Umständen erfüllt werden muss, die Concentration der secundären Harnsäure-Ionen (e) sehr gross wird, d. h. die Bildung eines secundären Salzes beginnt. Auch der Grad der Hydrolyse der secundären harnsauren Salze wird durch diesen Vorgang geregelt.

Aus diesen Betrachtungen geht hervor, dass für das Verhalten der Harnsäure in wässriger Lösung vor Allem die Bestimmung der Löslichkeit und der Affinitätsconstanten von Wichtigkeit ist. Ueber diese soll in den folgenden Abschnitten berichtet werden.

### 3. Löslichkeitsbestimmung der Harnsäure im Wasser.

#### Aeltere Bestimmungen.

Bevor wir auf die eigenen Versuche eingehen, seien zunächst die in der Litteratur verzeichneten Löslichkeitsangaben erwähnt, soweit sie uns zugänglich waren.

Die ältesten Bestimmungen über die Löslichkeit der Harnsäure weichen recht erheblich von einander ab. Prout und Mitscherlich fanden für kaltes Wasser übereinstimmend

das Verhältniss 1 : 10000, Henry dagegen 1 : 1720 in kaltem und 1 : 1400 in kochendem Wasser (citirt nach Berzelius, Lehrbuch der Chemie, übersetzt von Wöhler. 3. Aufl. (1840), Bd. IX, S. 409 ff.). Diejenige Löslichkeitsbestimmung, die lange Jahre hindurch als die zuverlässigste gegolten hat, wurde von A. Bensch<sup>1)</sup> im Liebig'schen Laboratorium zu Giessen ausgeführt. Reine, aus primärem harnsaurem Kalium mit Salzsäure gefällte Harnsäure wurde mit heissem Wasser gut ausgewaschen, dann in einem Kolben eine halbe Stunde hindurch mit Wasser gekocht, wobei noch Harnsäure ungelöst blieb, die Flüssigkeit durch ein heisses Filter, das zuvor mit heissem Wasser ausgewaschen war, filtrirt, das Filtrat in einem gut schliessenden Stöpselglase gewogen und im Wasserbade abgedampft. Der Rückstand, der bei 110° völlig getrocknet wurde, betrug

bei 109,20 g der heissen Flüssigkeit	0,0685 g
„ 109,20 „ „ „ „	0,0600 „

Daraus berechnete Bensch, dass die Harnsäure 1800 bis 1900 Theile siedendes Wasser zur Auflösung brauche.

Zur Bestimmung der Löslichkeit in kaltem Wasser wurde die gewaschene Harnsäure mit Wasser gekocht und die Flüssigkeit, nachdem sie acht Tage bei einer Temperatur von 20° gestanden hatte, abfiltrirt.

110,91 g Flüssigkeit enthielten	0,0075 g Harnsäure
110,91 „ „ „ „	0,00725 „ „

Danach löst sich 1 Theil Harnsäure in 14800—15300 Theilen Wasser von 20°.

Im Jahre 1888 sahen sich Behrend und Roosen<sup>2)</sup> veranlasst, die Löslichkeit der Harnsäure nochmals zu bestimmen, weil die von Bensch gefundene Löslichkeit von derjenigen abwich, welche sie bei einer synthetisch dargestellten Säure beobachtet hatten. Das von ihnen eingeschlagene Verfahren beschreiben sie folgendermaassen: Natürliche und synthetische Harnsäure wurden in heissem Wasser gleichzeitig unter genau gleichen Umständen gelöst. Die Temperatur des

<sup>1)</sup> Annalen der Chemie und Pharmacie 54, 189 (1845).

<sup>2)</sup> Annalen der Chemie und Pharmacie 251, 250 (1889).

letzteren betrug am Tage nach der Lösung 27°. Nach acht-tägigem Stehen (Temperatur des Wassers 18,5°) wurde vom Ungelösten abfiltrirt und je 200 ccm. der Lösung in einer Platinschaale verdampft. Der Rückstand wurde bei 110° getrocknet und gewogen.

Ein erster Versuch, bei dem Gefässe aus gewöhnlichem Glas benutzt wurden, ergab folgende Löslichkeitsverhältnisse:

Natürliche Harnsäure . . . . .	1:5799
Synthetische Harnsäure . . . . .	1:6185

Als aber Gefässe aus bestem böhmischen Glase und Wasser, welches aus solchen nochmals destillirt war, verwendet wurden, hinterliessen:

200 ccm. Lösung 0,0199 g natürliche Harnsäure,	
200 ccm.     >     0,0198 g synthetische Harnsäure.	

Daraus berechnet sich die Löslichkeit in Wasser von 18,5°  
der natürlichen Harnsäure zu . . . 1:10050,  
der synthetischen Harnsäure zu . . 1:10100.

Diese Bestimmungsmethode ist nach den Erfahrungen anderer Autoren nicht ganz einwandfrei.

Schon 1875 hatte Magnier de la Source<sup>1)</sup> darauf hingewiesen, dass die Harnsäure in wässriger Lösung allmählich zersetzt wird, und dass ihre Löslichkeit je nach den Versuchsbedingungen in weiten Grenzen schwankt. Diese Arbeit ist trotz ihres wichtigen Inhaltes wenig beachtet worden und erfordert daher an dieser Stelle eine etwas ausführlichere Besprechung.

Magnier de la Source kommt zu folgenden Resultaten:

1. Der Löslichkeitscoefficient der Harnsäure ist nicht nur eine Function der Endtemperatur, sondern auch der Maximaltemperatur, welche das Gemisch von Wasser und Harnsäure zu irgend einer Zeit erreicht hat. So fand er, dass der Löslichkeitscoefficient unter verschiedenen nicht näher beschriebenen Versuchsbedingungen für 15° zwischen 1:1500 und 1:19000 lag.

2. Bei einer kaltgesättigten Harnsäurelösung ist der Lös-

---

1) Action de l'eau sur l'acide urique. *Bullet. de la Société chimique*, 23, S. 483 (1875).

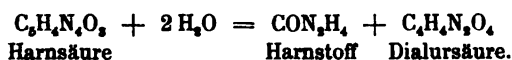
lichkeitscoefficient eine Function der Zeit, während welcher der Contact stattgefunden hat. Er wurde z. B. 36 Stunden nach dem Ansetzen der Lösung zu 1 : 30000 und nach 6 Tagen zu 1 : 12000 gefunden.

Ferner fand er, dass aus 100 ccm. einer alkalischen Lösung von harnsaurem Kalium, welche 1 g Harnsäure im Liter enthielt, am Tage der Bereitung nach Zusatz von 2 ccm. Salzsäure 0,094 g Harnsäure ausfielen. Darnach blieben in 100 ccm. des Filtrates 0,006 g Harnsäure gelöst, und 100 ccm. der alkalischen Lösung auf 600 ccm. verdünnt und mit 12 ccm. Salzsäure versetzt sollten 0,1—0,036 = 0,064 g Harnsäure geben. Statt dessen fiel nur eine unwägbare Menge schöner tetraedrischer Krystalle aus. Jene Lösung von harnsaurem Kali blieb im verschlossenen Gefäss stehen.

Nach 11 Tagen gaben 100 ccm. mit 2 ccm. Salzsäure  
nur 0,0470 g Harnsäure.

Nach 25 Tagen gaben 100 ccm. mit 2 ccm. Salzsäure  
keinen Niederschlag.

Der Rest der Flüssigkeit gab mit Essigsäure genau neutralisirt einen reichlichen, weissen, käsigen Niederschlag, der in überschüssiger Essigsäure und Kali löslich war und sich an der Luft violett färbte. Um dieses Zersetzungsprodukt genauer kennen zu lernen, löste Magnier 8 g Harnsäure mittelst überschüssigen Kalis in 2 Litern Wasser, erwärmte 30 Stunden unter Luftabschluss auf 100°, wobei reichlich Ammoniak entwich. Beim Neutralisiren mit Essigsäure fiel unter Entweichen von Kohlensäure wieder ein voluminöser Niederschlag aus, der, unter Luftabschluss gesammelt und ausgewaschen, bei Berührung mit Luft dieselbe schöne violette Farbe annahm, wie isoalloxansaures Kalium. Wegen dieser charakteristischen Reaction und der fast absoluten Unlöslichkeit des primären Kaliumsalzes in Wasser schien es nicht zweifelhaft zu sein, dass der Niederschlag aus dialursaurem Kalium bestand. Der Zerfall der Harnsäure sollte unter Aufnahme von Wasser nach folgender Gleichung vor sich gehen:



Der gebildete Harnstoff zerfiel in Ammoniak und Kohlensäure.

Dieselbe Zersetzung wurde durch Einwirkung von reinem Wasser auf Harnsäure herbeizuführen versucht. In 300 ccm. Wasser wurden unter Abschluss der Luft 0,216 g Harnsäure gelöst und 50 Stunden lang auf 100° erwärmt. Nach dieser Zeit war die Harnsäure verschwunden; die Anfangs gegen Lackmus vollkommen neutrale Flüssigkeit reagierte deutlich sauer. Während des Erhitzens war langsam, aber anhaltend Ammoniak entwichen. Einige Tropfen dieser Flüssigkeit hinterliessen beim Verdampfen mikroskopisch gut erkennbare Tetraeder, untermischt mit langen feinen Nadeln, die in Alkohol unlöslich waren. Andererseits gab die Lösung nach dem Neutralisiren mit Kali einen leichten Niederschlag, der sich an der Luft färbte. Die Nadeln wurden deshalb als krystallisirte Dialursäure angesprochen. Die Tetraeder, welche fast den ganzen Rückstand ausmachten, ähnelten denjenigen vollständig, die bei der Fällung von Harnsäure aus sehr verdünnten Lösungen beobachtet werden. Magnier hält sie für ein Hydrat der Harnsäure und identisch mit der von Städeler beschriebenen Uroxansäure. Diese ist im Wasser löslicher wie die Harnsäure. Magnier fasst seine Resultate in folgenden Sätzen zusammen:

1. Harnsäure hat in sehr verdünnten Lösungen einen veränderlichen Lösungscoefficienten, der um so höher ist, je verdünnter die Lösung.

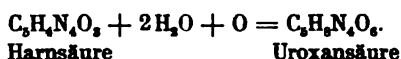
2. Diese Zunahme der Löslichkeit beruht auf der Bildung eines leichter löslichen Hydrates (Uroxansäure) und auf dem Zerfall der Harnsäure in Harnstoff und Dialursäure, welch' letztere durch die Schwerlöslichkeit ihres Kalisalzes und dessen Eigenschaft, in Isoalloxanat überzugehen, charakterisirt ist.

Zu dieser im zweiten Satze gegebenen Erklärung sei bemerkt, dass der Uebergang der Harnsäure in ein leichter lösliches Hydrat sehr unwahrscheinlich ist und dass die Uroxansäure Städeler's von Strecker<sup>1)</sup> als ein Oxydationsprodukt

---

1) Annalen der Pharmacie und Chemie, S. 155, 177.

der Harnsäure charakterisirt worden ist, welche nach der Gleichung entsteht:



Städeler hatte die Uroxansäure nur als ein Additionsprodukt von Harnsäure und Wasser aufgefasst.

Zu ganz ähnlichen Ergebnissen in Bezug auf die leichte Zersetzlichkeit der Harnsäure in wässriger Lösung kamen Blarez und Denigès.<sup>1)</sup> In einer Vorarbeit hatten sie ermittelt (ibid. Seite 789), dass die Harnsäure und ihre Salze auf kaltem Wege durch Titriren mit Kaliumpermanganat bestimmt werden können, vorausgesetzt, dass:

1. Die Concentration der Harnsäure das Verhältniss 1 : 8000 nicht überschreitet;
2. die Menge der Harnsäure unter 0,1 g liegt;
3. 3,5 g Schwefelsäure (auf 200 ccm. Flüssigkeit) zugesetzt werden;
4. zuvor die Menge Kaliumpermanganat ermittelt wird, die erforderlich ist, um das angewandte Wasser roth zu färben.

Unter diesen Bedingungen wird nach Angabe der Autoren 1 ccm.  $\frac{1}{10}$  Kaliumpermanganatlösung durch 0,0074 g Harnsäure entfärbt. Wir haben ebenfalls eine grosse Reihe von Titrirversuchen unter Einhaltung dieser Vorschriften und auch in anderer Weise angestellt, welche zu keinem befriedigenden Resultate führten. Ueber diesen Punkt soll später ausführlicher die Rede sein.

Mittelst dieser Methode bestimmten Blarez und Denigès den Harnsäuregehalt von Lösungen und kamen dabei zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Bestimmung der Löslichkeit von Harnsäure in Lösungen, die bei Siedetemperatur gesättigt und bis zur gewünschten Temperatur in Gegenwart krystallisirter Säure abgekühlt werden, gibt ungenaue Resultate wegen der grossen Leichtigkeit, mit der die Lösungen übersättigt bleiben, und mit

---

<sup>1)</sup> Compt. rend., 104, 1847 (1887).



der bei hohen Temperaturen Hydratationsprodukte der Harnsäure entstehen, die sehr viel Kaliumpermanganat verbrauchen. Daher müssen für gleiche Mengen Harnsäure, je nach der Schnelligkeit des Erkaltens, ganz verschiedene Mengen Kaliumpermanganat angewendet werden.

So wurde, wenn die Dauer des Erkaltens von  $100^{\circ}$  auf  $10^{\circ}$  zwischen einer halben Stunde und 6 Tagen schwankte, von einer und derselben Harnsäurelösung (100 ccm.) Kaliumpermanganat entsprechend 3,9 bis 5,6 mg Harnsäure verbraucht.

Dagegen waren die Zahlen constant, wenn die Lösungen bei der gewünschten Temperatur unter häufigem Schütteln bereitet wurden, vorausgesetzt, dass die Berührung, namentlich bei höheren Temperaturen, eine gewisse Zeit nicht überschritt. So verbrauchten 100 ccm. einer Lösung bei einer Berührungsdauer von 2 Stunden bis 4 Tagen stets dieselbe Menge Kaliumpermanganat entsprechend 3,7 mg Harnsäure und erst nach 6 Tagen entsprechend 3,8 mg. Ferner stellten Blarez und Denigès fest, dass bei  $10^{\circ}$  die Sättigung der Lösungen schon in sehr kurzer Zeit erfolgt. Sie ordneten ihre Versuche in folgender Weise an: ein rascher Strom feuchter Luft, die bei der fraglichen Temperatur mit Wasserdampf gesättigt war, strich durch eine Reihe von Flaschen, die in einem Thermostaten standen und deren jede 250 ccm. Wasser und 1 g chemisch reiner Harnsäure enthielt. Von 4 zu 4 Stunden wurde eine Flasche herausgenommen, 100–200 ccm. durch ein besonderes mit Papiermehl präpariertes Filter filtrirt und mit  $\frac{1}{100}$  oder  $\frac{1}{10}$  Kaliumpermanganatlösung unter Einhaltung der oben erwähnten Vorsichtsmassregeln titirt.

Wurde die Temperatur als Abscisse, die Zahl der in 100 ccm. gelösten Milligramme Harnsäure als Ordinate aufgetragen, so ergab sich eine Löslichkeitscurve, die durch die Gleichung dargestellt werden konnte:

$$x = 2 + 0,15 t + 0,0020 t^2 + 0,000025 t^3.$$

Die Uebereinstimmung der mit den thatsächlich beobachteten Daten ist an der Curve sehr deutlich ersichtlich.

Temperatur:	Milligramme Harnsäure in 100 ccm. gelöst	
	gefunden:	berechnet:
0°	2	2
10°	3,7	3,7
20°	6	6
30°	8,8	8,9
40°	12,2	12,8
50°	17,0	17,6
60°	23,0	23,6
70°	30,5	30,8
80°	39,0	39,6
90°	49,8	49,9
100°	62,5	62,0

Für 20° beträgt demnach der Löslichkeits-  
1:16 670.

1895 hat Fred. J. Smale<sup>1)</sup> die Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von Neuem bestimmt, indem er dieselbe im Innern eines Thermostaten in beständiger, starker Bewegung erhielt. Auf diese Weise wurde der Sättigungszustand in 1 1/2 Stunden erreicht. Den Gehalt der Lösung bestimmte Smale auf dreierlei Weise: durch Ausfällen mit Silbernitrat, Silberlösung, mit Salzsäure und durch Wägung des Niederschlagsrückstandes. Letzteren Werth nennt er *residue*.

In 100 ccm. Wasser von 40° waren 12,2 mg. Harnsäure gelöst.

Nach der Methode Ludwig-Salkowski<sup>2)</sup> fand er 12,8 mg. Harnsäure.

• dem Ausfällen mit Salzsäure . . . . . fand er 12,0 mg. Harnsäure.

durch Bestimmung des Abdampfrückstandes . . . . . fand er 12,0 mg. Harnsäure.

Das Löslichkeitsverhältniss berechnet er aus dem Mittel der letzteren drei Bestimmungen zu 1:16 670.

Genauere Angaben über die Verhältnisse, unter denen die Bestimmungen vorgenommen wurden, sind nicht vorhanden. Es ist zu bemerken, dass die Gläser, in denen die Bestimmungen vorgenommen wurden, aus gewöhnlichem Glas waren, und dass die Harnsäure in der Weise zugegeben wurde, dass sie sich gleichmäßig auf der Gefässwand vertheilte. Die Anwendung der Ludwig-Salkowski'schen Methode zur Bestimmung der Harnsäure ohne Correcturen ist nicht zu empfehlen, da diese Methode eine relativ grosse Menge Harnsäure erfordert, und die Bestimmung der Harnsäure durch Wägung des Abdampfrückstandes eine sehr ungenaue ist.

Die letzte Löslichkeitsbestimmung von Smale<sup>1)</sup> ist die genaueste, da sie in der Weise ausgeführt wurde, dass die Harnsäure in der Weise zugegeben wurde, dass sie sich gleichmäßig auf der Gefässwand vertheilte.

zurückzog. Er fand, dass in 100 ccm. Wasser von 40° 12,2 mg. Harnsäure gelöst sind.

1) Bei dieser Bestimmung wurde das Verhältniss der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 40° zu der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 100° bestimmt.

2) Bei dieser Bestimmung wurde das Verhältniss der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 40° zu der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 100° bestimmt.

3) Bei dieser Bestimmung wurde das Verhältniss der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 40° zu der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 100° bestimmt.

4) Bei dieser Bestimmung wurde das Verhältniss der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 40° zu der Löslichkeit der Harnsäure in Wasser von 100° bestimmt.

zur Ausführung  
Ferner F. Kohl-  
polyte. Leipzig 1898,

bei 18° . . . . . 0,0062 g = 1:16 130  
 „ 37° . . . . . 0,0072 „ = 1:13 900.

Die Hauptergebnisse der bisherigen Untersuchungen sind auf nachstehender Tabelle übersichtlich zusammengestellt.

Tabelle 1.

Löslichkeit der Harnsäure in Wasser nach verschiedenen Autoren.

Temperatur	Bestimmungsmethode	Löslichkeitsverhältniss	In einem Liter sind gelöst Gramm Harnsäure	Anzahl der Liter, in denen ein Mol <sup>1)</sup> = 166 g gelöst ist	Autor
kalt	—	1:10 000	0,100	1680	{ Prout und Mitscherlich
kalt	—	1:1720	0,581	289,3	Henry
20°	Lösung durch Kochen bereitet, 8 Tage lang auf 20° abgekühlt	{ 1:14 800 bis 1:15 300	{ 0,068 bis 0,065	2490 bis 2570	Bensch
18,5°	Lösung durch Kochen in Gefässen aus böhmischem Glase bereitet. 8 Tage lang auf 18,5° abgekühlt	{ 1:10 075	0,099	1690	{ Behrend und Roosen
20°	Kurz dauernde Berührung fester Säure mit Lösung unter Durchleitung feuchter Luft bei der Bestimmungstemperatur. Titrieren mit Kaliumpermanganat	{ 1:16 700	0,060	2803	{ Blarez und Denigès
40°	Schütteln der festen Säure mit der Lösung bei der Bestimmungstemperatur. Wägen des Abdampfrückstandes	{ 1:2400	0,420	400	Smale
18°	Lösung bei der Bestimmungstemperatur. Zurückwägen des ungelösten Rückstandes	{ 1:16 130	0,062	2710	Nicolaier

1) W. Ostwald hat vorgeschlagen, an Stelle des unbequem langen Wortes «Grammmolekulargewicht», d. h. das in Gramm ausgedrückte Molekulargewicht den kurzen Ausdruck «Mol» zu setzen.

### Unsere Löslichkeitsversuche.

Unter Berücksichtigung der oben mitgetheilten älteren Bestimmungsmethoden und auf Grund zahlreicher eigener, in dieser Richtung angestellter Versuche halten wir für eine einwandfreie Versuchsanordnung folgende Gesichtspunkte für massgebend:

1. Verwendung reiner Harnsäure.
2. Verwendung möglichst reinen, kohlensäurefreien Wassers. Der Grad der Reinheit ist durch die elektrische Leitfähigkeit zu ermitteln.
3. Benutzung widerstandsfähiger Glasgeräte.
4. Die Lösung ist durch Schütteln fester Säure mit Wasser bei der Versuchstemperatur herzustellen.
5. Die Gehaltsbestimmung der Lösung hat möglichst bald nach Erreichung des Sättigungspunktes zu geschehen.
6. Der Gehalt der Lösung ist durch Rückwägen der nicht gelösten Säure zu bestimmen.

Da es für die Beurtheilung der von uns erhaltenen Resultate nöthig ist, die Massnahmen kennen zu lernen, die wir bei unseren Versuchen zur Erreichung dieser Bedingungen getroffen haben, und da diese auch bei den später zu beschreibenden Löslichkeitsversuchen mit den Salzen zur Anwendung kamen, seien dieselben hier eingehend mitgetheilt.

Versuchsanordnung. Ueber die von uns benutzten Präparate reiner Harnsäure ist bereits oben die Rede gewesen (Seite 3). Bei der Reinigung des Wassers war Folgendes zu beobachten:<sup>1)</sup> Das gewöhnliche destillirte Wasser enthält je nach der Art seiner Herstellung gewisse Stoffe in relativ grosser Concentration gelöst, sodass seine Verwendung zur Bestimmung der Löslichkeit so schwer löslicher Körper wie die Harnsäure nicht einwandfrei ist. Ausser den nicht flüchtigen Stoffen, welche von der Berührung mit dem Kühler, den Gefässwänden

---

<sup>1)</sup> Vergleiche: W. Ostwald, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen. Leipzig 1893, S. 279. Ferner F. Kohlrausch und L. Holborn, Das Leitvermögen der Elektrolyte. Leipzig 1898, S. 111.

und den Fingern herrühren oder durch Ueberspritzen aus der Destillirblase in das Destillat gelangen, enthält das Wasser Kohlensäure, Ammoniak und andere flüchtige Stoffe, die vorher im Wasser enthalten waren und bei der Destillation mit übergehen oder während des Destillationsprocesses oder beim Aufbewahren in schlecht verschlossenen Gefässen aus der Luft des Laboratoriums absorbirt werden. Besonders das anfänglich übergehende Destillat ist, wie F. Kohlrausch angibt, sehr oft unreiner als der Vorrath im Destillirkolben. Die Concentration dieser Stoffe lässt sich annähernd aus der elektrischen Leitfähigkeit berechnen, da man weiss, dass die molekulare elektrische Leitfähigkeit der hier in Frage kommenden Neutralsalze in sehr grosser Verdünnung bei 18° ca. 115 beträgt. Die specifische elektrische Leitfähigkeit des gewöhnlichen destillirten Wassers schwankt nach unseren Erfahrungen zwischen  $3 \times 10^{-6}$ , d. h. ein Würfel von 1 cm. Kantenlänge hat zwischen zwei parallelen Seitenflächen einen Widerstand von  $\frac{1}{3 \times 10^{-6}}$  bis  $\frac{1}{10 \times 10^{-6}}$  Ohm. Dieselbe specifische Leitfähigkeit hat eine Lösung der Neutralsalze in ganz reinem Wasser, wenn sie in  $\frac{115}{3 \times 10^{-6}}$  bzw.  $\frac{115}{10 \times 10^{-6}}$  ccm. oder ca. 38 000 bzw. 11 500 l. im Ganzen 1 Mol der verschiedenen verunreinigenden Salze gelöst enthält. Den Gehalt an freier Kohlensäure kann man durch Titiren mit sehr verdünntem Barytwasser ermitteln. Nach Versuchen, die der Eine von uns anstellte,<sup>1)</sup> brauchten 300 ccm. destillirtes Wasser durchschnittlich 4 ccm.  $\frac{1}{16}$  Barytwasser zur Neutralisation, was einer Concentration von 1 Mol  $\text{CO}_2$  in 1200 l. entspricht. Hierbei sei noch bemerkt, dass nach W. Ostwald<sup>2)</sup> das frisch destillirte Wasser, wenn man keine besonderen Massregeln dagegen getroffen hat, stets mehr Kohlensäure enthält, als dem Partialdruck derselben in der Luft entspricht. Bei der Berührung mit Luft entweicht

<sup>1)</sup> Theodor Paul, Untersuchungen über fractionirte Fällung. Zeitschrift für physikalische Chemie, Bd. XIV, S. 107 (1894).

<sup>2)</sup> Zeitschrift für physikalische Chemie, Bd. IV, S. 491, Referat 80.

allmählich die überschüssige Kohlensäure, wodurch die elektrische Leitfähigkeit des betreffenden Wassers vermindert wird.

Vergleichen wir nun mit der Concentration dieser im gewöhnlichen destillirten Wasser enthaltenen Stoffe die Menge der Harnsäure, welche in einer gesättigten Lösung enthalten ist und bei einem Löslichkeitsverhältniss von 1:39480 1 Mol in 6640 Litern beträgt, so finden wir, dass die Menge der fremden Salze ca.  $\frac{1}{6}$ — $\frac{1}{2}$  dieser Harnsäure ausmacht und die Kohlensäure sogar in der fünffachen Menge vorhanden ist. Wenn auch die Neutralsalze starker Säuren im Allgemeinen keinen grossen Einfluss auf die Löslichkeit der Harnsäure ausüben werden, so vermögen doch diejenigen schwacher Säuren, wie z. B. kiesel-saure Alkalien und Erdalkalien, die Löslichkeit der Harnsäure merklich zu erhöhen, während ein Ammoniakgehalt, der in vielen Wässern vorkommt, sogar einen recht erheblichen Einfluss in dieser Richtung ausübt. Die freie Kohlensäure vermindert wegen der Rückdrängung der Dissociation der Harnsäure deren Löslichkeit. Bedenkt man ferner, dass die ersten Antheile des bei der Destillation übergehenden Wassers oft ganz besonders stark (Ammoniak!) verunreinigt sind, so sieht man, welcher Werth auf eine sachgemässe Prüfung des zu verwendenden Wassers gelegt werden muss, und dass die Löslichkeitsangaben, bei denen der Nachweis einer solchen Prüfung fehlt, nicht einwandfrei sind.

Zur Darstellung eines brauchbaren Wassers benutzten wir einen sogenannten Beindorf'schen Destillirapparat, wie solche in den Apotheken zum Destilliren aromatischer Wässer Verwendung finden. Dieser Apparat besitzt zwei Destillirblasen, eine äussere und eine innere, welche so angeordnet sind, dass die in der äusseren Blase entwickelten Wasserdämpfe durch die innere Blase streichen müssen, ehe sie in der Kühlschlange condensirt werden. In die äussere Destillirblase wurde Wasserleitungswasser gebracht, aus welchem durch Vermischen und längeres Stehenlassen mit überschüssiger Kalkmilch der grösste Theil der alkalischen Erden abgeschieden war. Mittelst eines Hebers konnte dieses Wasser je nach Bedarf aus den grossen Glasballons in die Blase übergeführt

werden. Um Ammoniak und andere flüchtige Basen zurück zu halten, befand sich in der äusseren Blase stets überschüssige reine Phosphorsäure. In die innere Blase wurde etwas Kalkmilch gebracht, um die mechanisch übergerissene Phosphorsäure und flüchtige Säuren zu neutralisiren. Da beim lebhaften Destilliren stets kleine Mengen Flüssigkeit in Form von kleinen Tröpfchen aus dem Destillirgefäss mit übergerissen werden, wurden zwischen den Helm und die innere Destillirblase mehrere Lagen dünnen Baumwollstoffs ausgespannt. Der käufliche hydrophile Verbandstoff eignet sich hierzu ganz vortrefflich. Das überdestillirende Wasser wurde von Zeit zu Zeit auf seine elektrische Leitfähigkeit geprüft, da wir die Beobachtung machten, dass nicht nur das zuerst übergehende Wasser relativ stark verunreinigt war, sondern auch bei stetig fortschreitender Destillation ohne erkennbare Ursachen die elektrische Leitfähigkeit plötzlich stark anstieg, wodurch der ganze Vorrath unbrauchbar wurde. Es wurde nur solches Wasser benutzt, dessen specifische Leitfähigkeit unmittelbar nach der Destillation ca.  $0,5-0,8 \times 10^{-6}$  betrug.<sup>1)</sup> In gewöhnlichen Glasflaschen und beim Zutritt der atmosphärischen Luft ist Wasser von solcher Reinheit nicht lange haltbar, doch haben wir unser Ziel mit Hülfe eines Apparates erreicht, dessen Construction aus beistehender Zeichnung ersichtlich ist. Ein ca. 15 Liter fassender Kolben aus Jenaer Gerätheglas war mit einem viermal durchbohrten Korkstopfen verschlossen, der oben mit einer starken Schicht festen Paraffins überzogen war. Von den vier durch diesen Stopfen eingeführten Glasröhren diente die erste als Heber zum Einbringen und zur Entnahme des Wassers, die zweite zum Absaugen der Luft, die dritte zum Durchleiten kohlen-säurefreier Luft und die vierte war S-förmig gebogen und trug oben ein Natronkalkrohr von 2 cm. Weite und 25 cm. Länge.

1) Das reinste Wasser wurde bisher von F. Kohlrausch und Ad. Heydweiller durch Destillation im Vacuum dargestellt. Dasselbe hatte bei 18° die specifische Leitfähigkeit  $0,04 \times 10^{-6}$ . Bei Berührung mit der Luft steigerte sich die Leitfähigkeit in kurzer Zeit auf das Zehnfache. [Zeitschrift für physikal. Chemie Bd. 14, 317 (1894).]

Das zweite und vierte Rohr reichte bis unter den Stopfen, das erste und dritte bis auf den Boden der Flasche; alle vier konnten durch Quetschhähne abgeschlossen werden. Wie Kohlrausch gefunden hat, lässt sich der Gehalt des Wassers an flüchtigen Bestandtheilen durch Durchleiten kohlensäurefreier Luft beträchtlich vermindern. Nach den Versuchen, welche der Eine von uns in dieser Richtung angestellt hat, ging der Gehalt an Kohlensäure in 60 Liter Wasser durch 75 stündiges Durchleiten von kohlensäurefreier Luft von der Concentration 1 Mol in 1200 Litern auf Null zurück. Wir benutzten daher dieses Verfahren auch im vorliegenden Falle.

Nachdem das frisch destillirte Wasser in das grosse Aufbewahrungsgefäß übergeführt worden war, zeigte es in der Regel die specifische Leitfähigkeit  $0,8-1,0 \times 10^{-6}$ . Nach 12- bis 24 stündigem Durchleiten kohlensäurefreier Luft sank dieselbe auf  $0,7-0,9 \times 10^{-6}$ , während 1 Tropfen ca.  $\frac{1}{16}$  Barytwasser 300 ccm. des Wassers nach Zusatz von etwas Phenolphthalein sofort röthete. In unserem Aufbewahrungsgefäß hielt sich das Wasser in dieser Güte ca. 14 Tage, dann nahm allmählich die elektrische Leitfähigkeit zu, überschritt aber auch bei sechsmonatlichem Aufbewahren den Betrag von  $1,4 \times 10^{-6}$  nicht. Für unsere Versuche wurde stets kohlensäurefreies Wasser mit einer durchschnittlichen specifischen Leitfähigkeit von  $0,8-1,0 \times 10^{-6}$  benutzt. Um ferner zu constatiren, welchen Einfluss die Berührung mit der atmosphärischen Luft beim Eingiessen in die zur Löslichkeitsbestimmung dienenden Gefäße und die mehr oder weniger lange Berührung mit den Stopfen und Gefäßwandungen ausüben, wurden stets Kontrollbestimmungen in der Weise ausgeführt, dass neben den mit den zu lösenden Körpern beschickten Gefäßen auch solche mit reinem Wasser rotirten, welches nach der jeweiligen Rotationsdauer auf seine Leitfähigkeit geprüft wurde.

Schliesslich sei noch kurz des Apparates Erwähnung gethan, welchen wir zur Herstellung kohlensäurefreier Luft benutzten. Es bestand aus 4 U-förmig gebogenen Glasröhren von 2,5 cm. innerer Weite, deren Schenkel 30 cm. lang



waren und die in einer mit Sand gefüllten Holzkiste standen. Diese Röhren waren mit feinkörnigem, staubfreiem Natronkalk gefüllt. Um die Luft vor dem Eintritt in dieselben zu entwässern und ein Zerfliessen des Natronkalkes zu verhindern, wurde noch je eine Gaswaschflasche mit concentrirter und verdünnter Schwefelsäure vorgelegt, welche gleichzeitig der Luft beigemengtes Ammoniak und andere Basen absorbirten. Da die Luft in den chemischen Arbeitsräumen immer mehr oder weniger stark verunreinigt ist und wie wir mehrmals constatiren konnten, eine nicht zu beseitigende Verunreinigung des Wassers herbeiführen kann, empfiehlt es sich, atmosphärische Luft mittelst einer durch das Fenster geführten Röhrenleitung dem Apparat zuzuführen. Um die durch den Luftstrom aus den Natronkalkröhren mitgerissenen Staubtheilchen unschädlich zu machen, schalteten wir zwischen diese und dem Aufbewahrungsgefäss noch zwei mit Wasser gefüllte Gaswaschflaschen ein. Damit eine möglichst vollkommene Befreiung der Luft von Kohlensäure erzielt wird, darf der Luftstrom nicht zu stark gemacht werden.

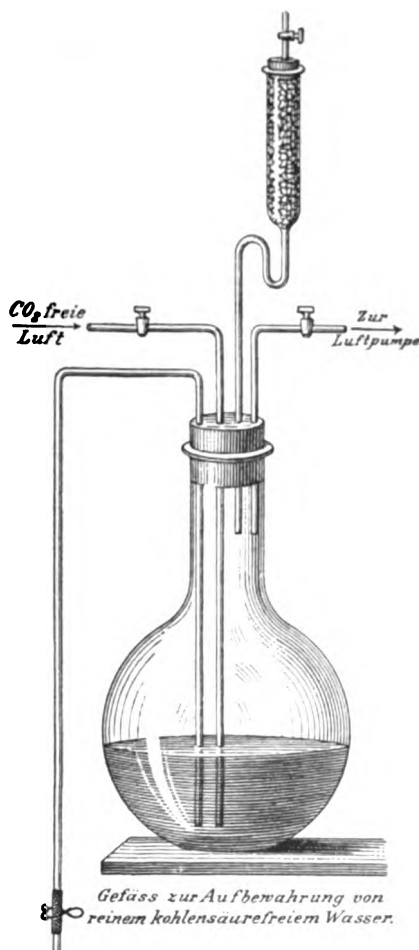
Für die Löslichkeits- und Gleichgewichtsversuche wurden ausschliesslich Gefässe aus Jenaer Gerätheglas benutzt. Am besten eigneten sich Erlenmeyer'sche Kölbchen von 100—800 ccm. Inhalt. Da auch von diesen Gefässen, wenn sie neu sind, an wässrige Lösungen etwas Alkali abgegeben wird, empfiehlt es sich, dieselben vor dem Gebrauch mit Wasserdampf zu behandeln. «Auf einen Kolben, in welchem Wasser siedet, ist zunächst ein Trichter gesetzt, in dessen Hals mittelst Kork eine aufrechte Glasröhre befestigt ist. Auf diese kommen mit der Oeffnung nach unten die zu behandelnden Flaschen und Gläser; das verdichtete Wasser fliesst in den Trichter; hat sich zuviel dort angesammelt, so lässt man es durch Lüften des Stopfens in die Flasche laufen. (Abegg.). Eine Behandlung von 10 bis 15 Minuten pflegt ausreichend zu sein; alsdann bläst man sofort die Gläser durch einen Luftstrom trocken.» <sup>1)</sup> Aus gebrauchten

<sup>1)</sup> Vergl. W. Ostwald, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen. Leipzig 1893. Seite 295.

Gläsern lassen sich auf diese Weise auch die letzten Spuren von Verunreinigungen leicht entfernen.

Die für den Rotationsapparat bestimmten Kölbchen wurden mit sorgfältig gereinigten Kautschukstopfen verschlossen, über welche wir zur Sicherheit noch eine Kautschukkappe zogen, die mit einem straff ansitzenden Gummiring versehen war. Wenn nach beendeter Rotationszeit der Raum zwischen Kautschukkappe und Stopfen trocken ist, kann man sicher sein, dass keine Verbindung des Flascheninhaltes mit dem Wasser des Rotationsapparats stattgefunden hat. Die mit Wasser und Säure beschickten Kölbchen wurden in den Rotationsapparat eingelegt, welchen A. A. Noyes für Löslichkeitsbestimmungen construiert hat.<sup>1)</sup>

Wir benutzten zwei derartige Apparate aus Zinkblech von 45 cm. Höhe, 45 cm. Breite und 70 cm. Länge, welche



<sup>1)</sup> Zeitschrift für physikalische Chemie 9, 606 (1892). Der Apparat ist auch abgebildet in W. Ostwald's physiko-chemischen Messungen Seite 212.

ca. 140 Liter Wasser fassten und in denen auf einer horizontal liegenden drehbaren Messingwelle mittelst starker Gummibänder eine Anzahl Erlenmeyer-Kölbchen befestigt werden konnten. Diese Welle wurde während der Versuchsdauer mit Hülfe eines kleinen Heissluftmotors<sup>1)</sup> langsam gedreht. Die Temperatur des Wassers wurde mit einem Ostwald'schen Thermoregulator geregelt und konnte bei der grossen Wassermasse bequem innerhalb  $0,05^{\circ}$  constant gehalten werden. Zu den Temperaturmessungen wurden in  $\frac{1}{100}$ -Grade getheilte Thermometer verwandt, die in der Glasbläserei von F. O. R. Götze in Leipzig hergestellt und von der Physikalisch-technischen Reichsanstalt geprüft waren.

Da man den Gehalt wässeriger Harnsäurelösungen weder durch Abdampfen noch durch Titriren einwandfrei bestimmen kann, wogen wir die ungelöste Säure zurück. Auch bei Benutzung von Kolben von 800 ccm. Inhalt ist die Gewichts-differenz noch verhältnissmässig klein und es ist deshalb wichtig, diese Wägungen so exact wie möglich auszuführen und die Harnsäure stets unter denselben Bedingungen zu wägen. Es wurde deshalb dasselbe Verfahren eingeschlagen, welches der Eine von uns bereits bei Löslichkeitsbestimmungen organischer Säuren angewandt hat.<sup>2)</sup> Das Sammeln und Wägen der im Wasser suspendirten Säure fand mit Hülfe des Gooch'schen Tiegels statt, welcher sich für diese Zwecke vorzüglich eignet.<sup>3)</sup> Das Absaugen der Aufschwemmungen

---

1) Die Motorenfabrik von Louis Heinrici in Zwickau liefert diese Motoren in 7 verschiedenen Grössen von  $\frac{1}{100}$  bis  $\frac{1}{5}$  Pferdekraft zum Preis von 35—500 Mk. Diese Heissluftmotoren arbeiten bei einem minimalen Verbrauch an Leuchtgas wochen- und monatelang ausserordentlich stetig und sicher. Bei früheren Versuchen war z. B. ein solcher Motor 5 Monate lang Tag und Nacht thätig, ohne auch nur ein einziges Mal zu versagen.

2) Th. Paul, Untersuchungen über fractionirte Fällung. Zeitschrift für physikal. Chemie 14, 108 (1894).

3) Vergl. Th. Paul, Ueber den Gooch'schen Tiegel. Zeitschrift für analytische Chemie 31, 537 (1892).

geschah stets so rasch, dass die geringe Temperaturdifferenz zwischen Lösung und Zimmerluft ohne Einfluss war. Die letzten an den Gefässwandungen hängenden Säuretheilchen wurden mittelst des zuerst durchgelaufenen Filtrates in den Tiegel gebracht. Beim Trocknen wurde die Wärme vollkommen ausgeschlossen, die Tiegel wurden in grosse mit Phosphorpentoxyd beschickte Exsiccatoren gesetzt; schon nach 24 Stunden trat in der Regel Gewichtsconstanz ein. Auch vor dem Einbringen in die Rotationsgefässe wurde die Harnsäure über Phosphorpentoxyd getrocknet.

Auf Grund dieser Versuchsanordnung haben wir eine grosse Reihe von Löslichkeitsbestimmungen ausgeführt, von denen wir die hauptsächlichsten folgen lassen.

### V Versuchsergebnisse.

1. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure von C. A. F. Kahlbaum, Berlin. Rotationsdauer bei allen 4 Versuchen 48 Stunden. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältniss	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit., in denen 1 Mol. Harns. gelöst ist
a	In 536,0 g Wasser waren gelöst 0,0860 g Harns.	1:6233	0,1604	1047
b	„ 522,0 „ „ „ 0,0967 „ „	1:5399	0,1852	906,9
c	„ 516,0 „ „ „ 0,0754 „ „	1:6842	0,1462	1150
d	„ 534,2 „ „ „ 0,0834 „ „	1:6404	0,1562	1076
Mittel:		1:6220	0,1620	1045

2. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure von E. Merck, Darmstadt. Ausser durch Rückwägen der nicht gelösten Harnsäure wurde der Gehalt der Lösung durch Verdampfen des Filtrates in einer Platinschaale auf dem Wasserbade und Wägen des Rückstandes bestimmt. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältnis	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit., in denen 1 Mol Harns. gelöst ist.
<i>a</i>	Nach einer Rotationsdauer von 24 Stunden waren in 514,8 g Wasser gelöst 0,0160 g 300 ccm. des Filtr. hinterliessen Rückst. 0,0096 g	1:32180 1:31250	0,0311 0,0320	5406 5250
<i>b</i>	Nach einer Rotationsdauer von 48 Stunden waren in 702,9 g Wasser gelöst 0,0617 g 300 ccm. des Filtr. hinterliessen Rückst. 0,0213 g	1:11400 1:14080	0,0878 0,0710	1914 2866
	Mittel aus den durch Rückwägen der ungelösten Säure ausgeführten Bestimmungen:	1:21790	0,0595	3660

3. Versuchsreihe. Löslichkeit der von uns aus dem Kaliumsalz dargestellten Harnsäure.

Ausser durch Rückwägen der nicht gelösten Harnsäure wurde der Gehalt der Lösung durch Verdampfen des Filtrates in einer Platinschaale auf dem Wasserbade und Wägen des Rückstandes bestimmt. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältnis	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit., in denen 1 Mol Harns. gelöst ist.
<i>a</i>	Nach einer Rotationsdauer von 24 Stunden waren in 637,5 g Wasser gelöst 0,0186 g 300 ccm. Filtrat hinterliessen Rückstand 0,0056 g	1:34270 1:53570	0,0292 0,0187	5757 9000
<i>b</i>	Nach einer Rotationsdauer von 48 Stunden waren in 674,5 g Wasser gelöst 0,0362 g 300 ccm. Filtrat hinterliessen Rückstand 0,0098 g	1:18630 1:30610	0,0537 0,0327	3130 5142
	Mittel aus den durch Rückwägen der ungelösten Säure ausgeführten Bestimmungen:	1:26450	0,0415	<del>4444</del>

Aus diesen drei Versuchsreihen geht, wie auch schon von anderen Autoren beobachtet wurde, Folgendes hervor:

1. Die Löslichkeit der Harnsäure schwankt zwischen ziemlich weiten Grenzen je nach der Versuchsdauer.

2. Die Löslichkeit der Harnsäure nimmt mit der Zeit der Berührung von Wasser und Harnsäure zu.

3. Die Gehaltsbestimmung einer Harnsäurelösung durch Verdampfen auf dem Wasserbade und Wägen des Rückstandes ist unsicher.

Da bei schwerlöslichen Körpern der Sättigungspunkt viel schneller erreicht wird, wie bei leichtlöslichen, verkürzten wir die Rotationsdauer sehr bedeutend und erhielten folgende Resultate:

4. Versuchsreihe. Löslichkeit der von uns aus dem Kaliumsalz dargestellten Harnsäure. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältniss	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit. in denen 1 Mol. Harns. gelöst ist.
a	Nach einer Rotationsdauer von 75 Minuten waren in 690,9 g Wasser gelöst 0,0182 g	1:37960	0,0263	6384
b	Nach einer Rotationsdauer von 4 $\frac{1}{2}$ Stunden waren in 506,3 g Wasser gelöst 0,0133 g	1:38070	0,0263	6403
Mittel:		1:38015	0,0263	6394

Aus diesen beiden zufällig fast vollkommen übereinstimmenden Versuchen geht hervor, dass:

1. Der Sättigungspunkt einer Harnsäurelösung beim Schütteln der festen Säure mit Wasser schon nach 75 Minuten erreicht wird;

2. eine Löslichkeitszunahme in den ersten Stunden nicht bemerkbar ist.

Um uns über das Löslichkeitsverhältniss der Harnsäure noch grössere Sicherheit zu verschaffen, haben wir auf Grund dieser Erfahrungen noch folgende Versuchsreihen ausgeführt. Das zu diesen Versuchsreihen benutzte Wasser war mit ganz besonderer Sorgfalt hergestellt und besass die spezifische Leitfähigkeit  $0,7 \times 10^{-6}$ .

5. Versuchsreihe. Löslichkeit der von uns aus dem Kaliumsalz dargestellten Harnsäure. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältnis	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit., in denen 1 Mol Harns. gelöst ist
a	Nach einer Rotationsdauer von 90 Minuten waren in 711,0 g Wasser gelöst 0,0179 g	1:39720	0,0252	6680
b	Nach einer Rotationsdauer von 3 Stunden waren in 687,5 g Wasser gelöst 0,0172 g	1:39970	0,0250	6723
	Mittel:	1:39845	0,0251	6702

6. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure von C. A. F. Kahlbaum, Berlin. Um etwa vorhandene geringe Mengen leichter löslicher Stoffe zu entfernen, wurde die Säure einige Male mit reinem Wasser ausgewaschen und über Phosphorpentoxyd getrocknet. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältnis	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit., in denen 1 Mol Harns. gelöst ist
a	Nach einer Rotationsdauer von 60 Minuten waren in 705,0 g Wasser gelöst 0,0175 g	1:40290	0,0248	6776
b	Nach einer Rotationsdauer von 2 1/2 Stunden waren in 692 g Wasser gelöst 0,0173 g	1:40000	0,0250	6728
	Mittel:	1:40145	0,0249	6752

7. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure von E. Merck, Darmstadt. Mit Wasser behandelt wie in der 6. Versuchsreihe. Temperatur 18°.

		Löslichkeits- verhältnis	In 1 Lit. Lösung sind enthalten Gramm Harns.	Anzahl der Lit., in denen 1 Mol Harns. gelöst ist
a	Nach einer Rotationsdauer von 90 Minuten waren in 715,0 g Wasser gelöst 0,0180 g	1:39720	0,0252	6680
b	Nach einer Rotationsdauer von 3 Stunden waren in 690,0 g Wasser gelöst 0,0172 g	1:40120	0,0249	6747
	Mittel:	1:39920	0,0251	6714

Fassen wir die Ergebnisse der Versuchsreihen 4, 5, 6 und 7, welche in Anbetracht der ausserordentlich geringen Löslichkeit der Harnsäure sehr gut untereinander übereinstimmen, zusammen, so erhalten wir als Mittel von

1 : 38 015	(4. Versuchsreihe)
1 : 39 845	(5.       "       )
1 : 40 145	(6.       "       )
1 : 39 920	(7.       "       )
<hr/>	
1 : 39 480.	

Bei 18° löst sich demnach die Harnsäure in reinem Wasser im Verhältniss 1:39480. In 1 Liter der gesättigten Lösung sind 0,0253 g Harnsäure enthalten oder in 6640 Litern der gesättigten Lösung ist ein Mol = 168,2 g Harnsäure gelöst. Die Löslichkeitsgrenze wird schon nach 1 Stunde erreicht, wenn die feinvertheilte Säure mit Wasser geschüttelt wird.

#### 4. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit und Affinitätsconstanten der Harnsäure.

##### Allgemeines.

Der Widerstand, welchen ein in Lösung befindlicher Elektrolyt dem Durchgange des elektrischen Stromes entgegengesetzt, hängt bei gleichbleibender Temperatur von der Concentration der Ionen und von deren Wanderungsgeschwindigkeit ab. Kennt man den Widerstand oder dessen reciproken Werth, die elektrische Leitfähigkeit, einer Lösung und die Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen, so lässt sich bei binären Elektrolyten, d. h. solchen Stoffen, die in zwei Ionen zerfallen, fast stets die Concentration der Ionen oder, was auf dasselbe hinauskommt, der Antheil der gelösten Substanz, welcher in Ionen zerfallen ist, der Dissociationsgrad berechnen. Eine wässrige Harnsäurelösung enthält, wie schon oben auseinander-gesetzt wurde, im Wesentlichen Wasserstoff-Ionen (H-Ionen) und primäre Harnsäure-Ionen ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ionen). Da die Wanderungsgeschwindigkeit der Wasserstoff-Ionen bekannt ist und die der primären Harnsäure-Ionen sich entweder, wie W. Ostwald gezeigt hat, aus der Analogie mit anderen Säuren



ermitteln oder aus der elektrischen Leitfähigkeit der primären harnsauren Salze bei grosser Verdünnung berechnen lässt, brauchen wir nur noch die elektrische Leitfähigkeit einer Harnsäurelösung zu bestimmen, um deren Dissociationsgrad kennen zu lernen.

Nun ist aber der Dissociationsgrad eine Function der Concentration der Lösung und nimmt im Allgemeinen zu, je verdünnter dieselbe wird, man müsste demnach eine sehr grosse Anzahl von Leitfähigkeitsbestimmungen ausführen, um für alle Concentrationen einen annähernd richtigen Werth zu erhalten.

Wie indessen W. Ostwald nachgewiesen hat,<sup>1)</sup> lässt sich für schwach dissociirte binäre Elektrolyte aus deren elektrischer Leitfähigkeit in wässriger Lösung eine von der jeweiligen Concentration derselben unabhängige «Dissociationsconstante» berechnen und es genügen nur wenige Bestimmungen bei verschiedenen Concentrationen, ja, streng genommen, nur eine einzige, um ein richtiges Bild vom Dissociationsverlauf durch alle Concentrationen hindurch zu erhalten. Die betreffend Gleichung, auf deren Begründung hier nicht näher eingegangen werden kann, lautet:

$$\frac{\mu_v^2}{\mu_\infty (\mu_\infty - \mu_v) v} = k.$$

In derselben ist  $k$  die Dissociationsconstante,  $\mu_v$  die molekulare elektrische Leitfähigkeit der wässrigen Lösung bei einer beliebig zu wählenden Concentration,  $v$  die Anzahl der Liter der Lösung, welche 1 Mol des Elektrolyten gelöst enthalten, und  $\mu_\infty$  die molekulare Leitfähigkeit desselben Elektrolyten bei unendlicher Verdünnung. Dieses  $\mu_\infty$  lässt sich in sehr wenigen Fällen durch direkte Messung bestimmen. Da sich dieser Werth additiv aus den Wanderungsgeschwindigkeiten der beiden Ionen zusammensetzt und diese mit grosser Genauigkeit ermittelt werden können, wird er praktisch aus denselben berechnet. Die Dissociationstheorie bietet grossen Vortheil, da sie mit Hilfe derselben das Ver-

<sup>1)</sup> W. Ostwald, Die Dissociationstheorie der Elektrolyten, Zeitschrift für physikalische Chemie 2, 270 (1889).

niss  $\frac{\mu_v}{\mu_\infty}$ , d. h. den Dissociationsgrad des Elektrolyten für jede beliebige Concentration der Lösung berechnen kann. Diese Beziehungen werden ohne Weiteres klar, wenn wir die obige Gleichung in folgender Weise umformen:

$$\frac{\left(\frac{\mu_v}{\mu_\infty}\right)^2}{\left(1 - \frac{\mu_v}{\mu_\infty}\right) v} = k$$

Ist die Dissociationsconstante  $k$  bekannt, und bezeichnen wir den jeweiligen Dissociationsgrad  $\frac{\mu_v}{\mu_\infty}$ , welcher in der Regel mit zunehmender Verdünnung wächst, mit  $m$ , so erhalten wir die einfache quadratische Gleichung

$$\frac{m^2}{(1-m) v} = k.$$

Multipliziert man den Werth von  $m$  mit 100, so erhält man den Dissociationsgrad, d. h. den in Ionen zerfallenen Anteil direkt in Procenten der gelösten Substanz.

Da der Dissociationsgrad einer Säure oder Base das allein richtige Maass für deren «Stärke» oder ihre chemische Reactionsfähigkeit ist, hat man die Dissociationsconstante auch mit den Namen «Affinitätsconstante» oder «Affinitätsgrösse» besetzt. Es ist ohne Weiteres ersichtlich, dass die Bestimmung der Grösse für das Verhalten der Harnsäure in wässrigen Lösungen, für die Gleichgewichte ihrer Salze bei Gegenwart anderer Säuren, für die Bildung primärer und secundärer etc. von grosser Wichtigkeit ist. Da die Harnsäure ausserordentlich wenig im Wasser löst und ihrem eigentlichen Verhalten nach eine sehr schwache Säure ist, ist die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit der wässrigen Lösungen mancherlei Schwierigkeiten. Vor Allem ist dabei daran, dass die spezifische Leitfähigkeit des zur Messung benutzten Wassers von der der Lösung bei Betrachtung in der Weise zu trennen muss, wie es werden kann, dass die Neutralsalze der Harnsäure schwache Säuren sind, die in wässriger Lösung zu einem grossen Theile in der Form der Harnsäure vorliegen.

Hydrolyse keine vollständige Salzbildung eintreten kann, so lässt sich doch auch nicht mit Sicherheit sagen, inwieweit die elektrische Leitfähigkeit der Harnsäure durch derartige Verunreinigungen beeinflusst wird. Wenn es sich um Concentrationen von 1000 Litern für 1 Mol Substanz handelt, kann eine Correctur in Bezug auf die spezifische Leitfähigkeit des zur Lösung verwandten Wassers vernachlässigt werden; im vorliegenden Falle beträgt aber die Verdünnung ca. 6600 Liter, so dass bei der spezifischen Leitfähigkeit  $1,0 \times 10^{-6}$  eines schon sehr reinen Wassers die Correctur für das Wasser 6,6 Einheiten ausmacht, d. h. ca. den 6. Theil der ca. 37 betragenden molekularen Leitfähigkeit der Harnsäurelösung.

### Versuchsanordnung.

Wir benutzten für unsere Bestimmungen ausschliesslich die Wechselstrommethode F. Kohlrausch's in der von W. Ostwald angegebenen Form.<sup>1)</sup> Das Widerstandsgefäss bestand aus einem cylindrischen Glasgefäss von 5 cm. Durchmesser und 10 cm. Höhe, welches oben geschlossen war und einen ca. 8 mm. weiten, ca. 14 cm. langen Tubus trug. Die  $4\frac{1}{2}$  cm. langen und  $3\frac{1}{2}$  cm. breiten Platinelektroden, deren Zuleitungsdrähte seitlich eingeschmolzen waren, standen senkrecht und hatten einen Abstand von ca. 0,6 cm. Ausserdem benutzten wir noch ein zweites ähnlich construirtes Gefäss, welches 2 Röhren trug und die Durchleitung kohlensäurefreier Luft gestattete. Beide Gefässe bestanden aus Jenaer Röhrenglas und hatten wochenlang mit öfters gewechseltem heissem Wasser angefüllt gestanden. Zum Platiniren der Elektroden benutzten wir eine ca. 3%ige wässrige Lösung des käuflichen Platinchlorids mit einem Zusatz von ca.  $\frac{1}{40}$ % Bleiacetat, wie dies von Lummer und Kurlbaum vorgeschlagen wurde.

Wir verfahren einmal in der Weise, dass wir die Harnsäure direkt im Leitfähigkeitsgefäss auflösten und von Zeit zu Zeit die elektrische Leitfähigkeit ermittelten, das andere

---

1) Vergl. W. Ostwald, Hand- und Hilfsbuch zur Ausführung physiko-chemischer Messungen. Leipzig 1893. Seite 265 ff.

Mal bereiteten wir die Lösung in einem besonderen Gefäss durch Rotation einer wässrigen Aufschwemmung und führten mittelst eines Hebers<sup>1)</sup> die abgesetzte Lösung in das Leitfähigkeitsgefäss über und schliesslich benutzten wir die von den Löslichkeitsversuchen herrührenden Filtrate. Die erste Methode hat zwar den grossen Vortheil, dass eine längere Berührung mit den Wänden eines zweiten Gefässes und dessen Stopfen, das Ueberführen der Lösung mit dem Heber bezw. Umgiessen der Lösung vermieden wird, wodurch immer geringe Verunreinigungen in die Lösung gelangen, doch haben wir andererseits im Laufe unserer Untersuchungen die Beobachtung gemacht, dass die mit Platinschwarz überzogenen Elektroden schon nach kurzer Zeit eine sehr störende Zersetzung der Harnsäurelösung bewirken. Ueber diesen Punkt wird weiter unten noch ausführlicher die Rede sein. Der Verlauf dieser Versuche wird durch nachstehende Protokolle am besten illustriert.

Schliesslich sei noch bemerkt, dass für diese Versuche nur solche Harnsäure zur Verwendung kam, welche wiederholt mit reinem Wasser durch Decantiren ausgewaschen worden war. Für die in Bezug auf die spezifische Leitfähigkeit des Wassers anzubringende Correctur wurde nicht der Werth benutzt, welchen das direkt aus dem Vorrathsgefäss entnommene Wasser besass, sondern die spezifische Leitfähigkeit des Wassers, welches bei einem blinden Versuch denselben Manipulationen wie die Harnsäurelösung unterworfen worden war.

Alle Bestimmungen wurden bei 18° ausgeführt. Als Einheit ist das Leitvermögen eines Körpers angenommen, von dem eine Säule von 1 cm. Länge und 1 cm. Querschnitt den Widerstand 1 Ohm besitzt.

### Versuchsergebnisse.

1. Versuchsreihe. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit wässriger Harnsäurelösungen, welche im Leitfähigkeits-

---

<sup>1)</sup> Wir benutzten dazu einen sogenannten «Giftheber». Vergl. F. Kohlrausch u. L. Holborn, *Das Leitvermögen der Elektrolyte* Leipzig 1898. Seite 132.

gefäß selbst bereitete wurden. In das Leitfähigkeitsgefäß wird reines Wasser von der specifischen Leitfähigkeit  $1,04 \times 10^{-6}$  gebracht und nach der Einstellung der Versuchstemperatur ( $18^{\circ}$ ) mit der Pipette etwas von einer mit demselben Wasser bereiteten Harnsäureaufschwemmung zugesetzt. Die Zeit (t) ist vom Einfließen der Harnsäureaufschwemmung ab gerechnet. Da hier die absoluten Leitfähigkeitszahlen nicht in Betracht kommen, sind der Einfachheit wegen die Werthe des Abschnittes a auf der Messbrücke in Millimetern angegeben. Zu allen 3 Versuchen diente die Harnsäure von C. A. F. Kahlbaum, Berlin.

### 1. Versuch.

t				a = Millimeter
	3 Minuten	.	.	88,6
	55	>	.	102,1
2 Stunden	40	>	.	104,1
3	25	>	.	106,1
4	10	>	.	107,6
17	—	>	.	177,0
29	—	>	.	380,0

### 2. Versuch. Dasselbe Leitfähigkeitsgefäß wie bei Versuch 1.

t				a = Millimeter
5 Stunden	30 Minuten	.	.	114,1
21	30	>	.	155,0
45	30	>	.	454,0

### 3. Versuch. Ein anderes Leitfähigkeitsgefäß wie bei Versuch 1 und 2.

t				a = Millimeter
	3 Minuten	.	.	106,5
	10	>	.	122,0
	25	>	.	126,5
	40	>	.	130,0
4 Stunden	—	>	.	132,5
4	30	>	.	134,0
6	—	>	.	137,0
21	—	>	.	144,0
24	—	>	.	153,0
28	—	>	.	157,5

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die elektrische Leitfähigkeit einer wässerigen Harnsäureaufschwemmung beständig zunimmt, und dass sich nicht mit Sicherheit feststellen lässt, wann der Sättigungspunkt erreicht ist. Ausserdem sei noch bemerkt, dass die Leitfähigkeit um einige Millimeter zurückging, wenn die klar abgesetzte Lösung aufgeschüttelt wurde. Für die Ursache dieser Erscheinung vermögen wir keine einwandfreie Erklärung abzugeben. Die in den beiden Tabellen gegebenen Zahlen beziehen sich auf die frisch aufgeschüttelten Lösungen. Ausserdem bemerkten wir, dass die elektrische Leitfähigkeit einer Lösung um so schneller zunahm, je öfter sie umgeschüttelt wurde.

2. Versuchsreihe. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit wässriger Harnsäurelösungen, welche in einem Kolben durch Rotiren einer Harnsäureaufschwemmung hergestellt und nach dem Absitzen der gröberen Theilchen mittelst eines Hebers in das Leitfähigkeitsgefäss übergeführt wurden.

Zu allen 4 Versuchen wurde Harnsäure von C. A. F. Kahlbaum, Berlin, benutzt.

	Rotationsdauer	Spec. Leitfähigkeit des denselben Manipulationen in einem blinden Versuch unterworfenen Wassers	Abzug für das Wasser	Molekulare Leitfähigkeit ohne Abzug des Wassers	Molekulare Leitfähigkeit nach Abzug des Wassers
a	1 Stunde	$0,95 \times 10^{-6}$	6,80	37,34	31,04
b	1    >    30 Minuten	$0,95 \times 10^{-6}$	6,80	39,11	32,81
c	2 Stunden —    >	$0,95 \times 10^{-6}$	6,80	39,11	32,81
d	5    >    30    >	$1,20 \times 10^{-6}$	7,96	40,33	32,37
			Mittel:	38,97	32,26

3. Versuchsreihe. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit wässriger Harnsäurelösungen, welche in einem Kolben durch Rotiren einer Harnsäureaufschwemmung hergestellt und nach dem Absitzen direkt in das Leitfähigkeitsgefäss eingegossen wurden. Zu beiden Versuchen benutzten wir die von uns aus dem Kalisalz dargestellte Säure.

	Rotationsdauer	Spec. Leitfähigkeit des denselben Manipulationen in einem blinden Versuch unterworfenen Wassers	Abzug für das Wasser	Molekulare Leitfähigkeit ohne Abzug des Wassers	Molekulare Leitfähigkeit nach Abzug des Wassers
a	75 Minuten	$1,17 \times 10^{-6}$	7,76	40,19	32,43
b	4 $\frac{1}{2}$ Stunden	$1,18 \times 10^{-6}$	7,76	38,48	30,72
			Mittel:	39,34	31,58

4. Versuchsreihe. Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit wässriger Harnsäurelösungen, welche in einem Kolben durch Rotiren einer Harnsäureaufschwemmung hergestellt und durch den Gooch'schen Tiegel abfiltrirt wurden. Die zuerst durchgelaufenen Antheile des Filtrats wurden nur zum Ausspülen des Leitfähigkeitsgefässes benutzt. Zu Versuch a wurde Harnsäure von E. Merck, Darmstadt, und zu b und c die von uns aus Kalisalz dargestellte Harnsäure benutzt.

	Rotationsdauer	Spec. Leitfähigkeit des denselben Manipulationen in einem blinden Versuch unterworfenen Wassers	Abzug für das Wasser	Molekulare Leitfähigkeit ohne Abzug des Wassers	Molekulare Leitfähigkeit nach Abzug des Wassers
a	1 Stunde	$1,0 \times 10^{-6}$	6,64	40,66	34,02
b	1 $\frac{1}{2}$ Stunden	$1,0 \times 10^{-6}$	6,64	37,11	30,47
c	3 „	$1,0 \times 10^{-6}$	6,64	40,80	34,16
			Mittel:	39,52	32,88

Während in den einzelnen Versuchsreihen die Werthe oft erheblich differiren, stimmen die Mittelwerthe unter Berücksichtigung der schwierigen Verhältnisse ganz vorzüglich überein. Obwohl den niedrigsten Werthen die grössere Wahrscheinlichkeit zugesprochen werden muss, halten wir es doch für zweckmässig, aus allen drei Versuchsreihen das Mittel zu ziehen und künftigen Berechnungen zu Grunde zu legen. Da die Harnsäure eine so schwache Säure ist, glauben wir den thatsächlichen Verhältnissen am nächsten zu kommen, wenn wir bei Berechnung der molekularen Leitfähigkeit die specifische Leitfähigkeit des Wassers gänzlich in Abzug bringen. Um aber eine Kritik der Zahlen zu ermöglichen, haben wir die

die Rechnung auf beide Arten ausgeführt.

### Molekulare elektrische Leitfähigkeit gesättigter wässriger Harnsäurelösungen.

Versuchsreihe	Ohne Berücksichtigung der Leitfähigkeit des Wassers	Nach Abzug der Leitfähigkeit des Wassers
2	38,97	32,26
3	39,34	31,58
4	39,52	32,88
Mittel:	39,28	32,24

### Berechnung der Affinitätsconstanten der Harnsäure in wässriger Lösung.

Wie schon oben bemerkt wurde, lautet die von W. Ostwald für die Berechnung der Affinitätsconstanten aufgestellte Gleichung:

$$\frac{\mu_v^2}{\mu_\infty (\mu_\infty - \mu_v) v} = k,$$

in welcher wir  $\mu_v$  und  $v$  kennen und  $\mu_\infty$  noch zu bestimmen haben. Die molekulare elektrische Leitfähigkeit einer wässrigen Harnsäurelösung setzt sich additiv aus der Wanderungsgeschwindigkeit des Wasserstoff-Ions und derjenigen des primären Harnsäure-Ions ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ions) zusammen. Erstere beträgt nach F. Kohlrausch<sup>1)</sup> bei 18° 318. Zur Berechnung der letzteren benutzten wir die molekulare elektrische Leitfähigkeit des primären harnsauren Natriums und Kaliums in grosser Verdünnung bei 18°.

Primäres harnsaures Natrium:

$$\begin{aligned} \mu_{2315} &= 63,0 & \mu_{2359} &= 64,2 \\ \text{Mittel: } \mu_{2337} &= 63,6 \end{aligned}$$

1) Eine übersichtliche Zusammenstellung der Wanderungsgeschwindigkeiten einer grösseren Anzahl von Ionen bei 18° findet sich bei F. Kohlrausch und L. Holborn, Das Leitvermögen der Elektrolyte, Leipzig, 1898, Seite 200.



Die Wanderungsgeschwindigkeit des Natrium-Ions bei derselben Verdünnung beträgt nach F. Kohlrausch 43,3, folglich bleiben für das primäre Harnsäure-Ion ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ion)  $63,6 - 43,3 = 20,3$  bei einer Verdünnung von ca. 2300 Liter.

Primäres harnsaures Kalium:

$$\begin{aligned} \mu_{1959} &= 84,8 & \mu_{1858} &= 83,3 \\ \text{Mittel: } \mu_{1256} &= 84,1 \end{aligned}$$

Die Wanderungsgeschwindigkeit des Kalium-Ions bei derselben Verdünnung beträgt nach F. Kohlrausch 63,8, folglich bleiben für das primäre Harnsäure-Ion ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ion)  $84,1 - 63,8 = 20,3$  bei einer Verdünnung von ca. 1250 Liter.

Da die Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit der Ionen von 1250 Liter zu 2300 Liter nur sehr gering ist — sie beträgt z. B. beim Essigsäure-Ion nur 0,2 Einheiten —, so ist die Uebereinstimmung der aus dem Natrium- und Kaliumsalz berechneten Wanderungsgeschwindigkeiten für das primäre Harnsäure-Ion eine ganz vorzügliche zu nennen. Die Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit des Essigsäure-Ions von 2000 Liter bis zur unendlichen Verdünnung beträgt 0,9 Einheiten und wir werden daher der Wahrheit sehr nahe kommen, wenn wir die Wanderungsgeschwindigkeit des primären Harnsäure-Ions ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ions) bei  $18^\circ = 21$  setzen. Der Werth  $\mu_\infty$  nimmt in Folge dessen für die Harnsäure in wässriger Lösung bei  $18^\circ$  den Werth  $318 + 21 = 339$  an.

Setzen wir in obiger Gleichung  $\mu_\infty = 339$ , so erhalten wir für die Affinitätsconstante der Harnsäure in wässriger Lösung bei  $18^\circ$ :

für  $\mu_{6640} = 39,28$  (ohne Abzug der Leitfähigkeit des zur Lösung angewandten Wassers)  $k = 0,00000229$  oder für den hundertmal grösseren Werth  $K = 0,000229$ ;

für  $\mu_{6640} = 32,24$  (nach Abzug der Leitfähigkeit des zur Lösung angewandten Wassers)  $k = 0,00000151$  oder für den hundertmal grösseren Werth  $K = 0,000151$ . Dieser letztere Werth soll späteren Rechnungen zu Grunde gelegt werden.

Der Dissociationsgrad  $m = \frac{\mu_v}{\mu_\infty}$  beträgt für eine gesättigte

wässrige Harnsäurelösung 0,116 ohne Abzug und 0,095 nach Abzug der Leitfähigkeit des Wassers oder es sind 11,6% bzw. 9,5% der Harnsäure in einer gesättigten wässrigen Lösung in das Wasserstoff-Ion (H-Ion) und in das primäre Harnsäure-Ion ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ion) zerfallen. Da in 1 Liter der bei 18° gesättigten wässrigen Lösung  $\frac{1}{6640}$  Mol Harnsäure enthalten sind, beträgt die Concentration der Wasserstoff-Ionen (H-Ionen) und der primären Harnsäure-Ionen ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ionen) je 0,0000175 bzw. 0,0000143 Mol und die der nicht dissociirten Harnsäuremolekeln 0,0001331 bzw. 0,0001363 Mol.

##### 5. Die Zersetzung der Harnsäure in wässriger Lösung.

Wie schon früher von anderen Autoren gefunden worden war und auch durch unsere Löslichkeitsbestimmungen bestätigt wurde, erleidet die Harnsäure in wässriger Lösung gewisse Umwandlungen oder Zersetzungen, welche mit der Zeit zunehmen und eine Erhöhung der Löslichkeit zur Folge haben. Welcher Art diese Vorgänge sind, lässt sich gegenwärtig noch nicht mit Bestimmtheit sagen, doch wollen wir an dieser Stelle einige Angaben machen, die sich aus der elektrischen Leitfähigkeit ergeben und für weitere Untersuchungen nach dieser Richtung als Anhaltspunkte dienen können. Aus der ersten Versuchsreihe der Leitfähigkeitsversuche geht hervor, dass die Zersetzung der Harnsäure eine Vermehrung der elektrischen Leitfähigkeit zur Folge hat. Dies kann entweder darauf beruhen, dass die Zahl der Ionen vermehrt wird, oder Ionen mit grösserer Wanderungsgeschwindigkeit entstehen. Da in einer Harnsäurelösung aber der weitaus grössere Theil der Elektrizität von den Wasserstoff-Ionen transportirt wird und Ionen mit grösserer Wanderungsgeschwindigkeit nicht bekannt sind, kann mit Sicherheit auf eine Vermehrung der Ionen in der Lösung geschlossen werden. Dass diese Vermehrung der Ionen nicht unbedeutend ist, geht aus der Thatsache hervor, dass im ersten Versuch der Schlitten der Messbrücke innerhalb 29 Stunden von 88,6 auf 380 Millimeter verschoben werden musste d. h. es fand eine Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit um das ca. 6 $\frac{1}{2}$ fache

fähigkeit einer gesättigten, filtrirten Harnsäurelösung beim Aufbewahren im Leitfähigkeitsgefäß abnahm. So betrug z. B. die molekulare Leitfähigkeit einer solchen Lösung

sofort gemessen	40,80
nach 30 Minuten	38,44
„ 2 Stunden	22,44
„ 15 $\frac{1}{2}$ „	29,44
„ 23 „	28,66

Um festzustellen, ob jede wässrige Harnsäurelösung beim Aufbewahren dieselbe schnelle Zersetzung zeigt oder ob hierbei die mit Platinschwarz überzogenen Elektroden eine Rolle spielen, stellten wir eine neue filtrirte Lösung her und bestimmten deren molekulare Leitfähigkeit sogleich nach dem Filtriren. Sie betrug 40,66. Dieselbe im Leitfähigkeitsgefäß aufbewahrte Lösung ging nach 14 $\frac{1}{2}$  Stunden auf 30,88 herab, während die Messung an einer in einem Glaskölbchen aus Jenaer Gerätheglas ebensolange aufbewahrten Probe den beinahe unveränderten Werth 40,46 ergab.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die mit Platinschwarz überzogenen Elektroden die Zersetzung der Harnsäure sehr beschleunigen. Dieser Umstand ist bei der Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit harnsäurehaltiger Lösungen wohl zu beachten. Ob die durch das Platinschwarz verursachte Zersetzung eine andere ist, als die durch das Wasser allein hervorgerufene, entzieht sich unserer Beurtheilung. Die Thatsache, dass in der filtrirten Lösung die Zersetzung mit einer Verminderung der elektrischen Leitfähigkeit einhergeht, steht mit deren Vermehrung in der wässrigen Aufschwemmung in keinem Widerspruch, da im letzteren Falle ein Ueberschuss fester Säure vorhanden ist der in dem Maasse in Lösung gehen kann, wie die gelösten Harnsäuremolekeln zersetzt werden. Hierfür spricht auch die oben erwähnte Thatsache, dass die Leitfähigkeit einer Aufschwemmung um so schneller zunimmt, je öfter sie umgeschüttelt wird.

## 6. Schlussfolgerungen.

Die Ergebnisse vorstehender Untersuchungen können wir kurz dahin zusammenfassen:

1. Im Gegensatz zu den bisherigen Bestimmungen, nach denen das Löslichkeitsverhältniss der Harnsäure in Wasser bei Zimmertemperatur 1:10075 (Behrend und Roosen) bis 1:16700 (Blarez und Denigès) beträgt, konnten wir feststellen, dass sich die Harnsäure in reinem Wasser bei 18° im Verhältniss 1:39480 löst. In 1 Liter der gesättigten Lösung sind 0,0253 g Harnsäure enthalten oder in 6640 Litern der gesättigten Lösung ist ein Mol = 168,2 g Harnsäure gelöst.

2. Die Löslichkeitsgrenze wird schon nach 1 Stunde erreicht, wenn die feinvertheilte Harnsäure mit Wasser geschüttelt wird.

3. Durch Abkühlen der heissgesättigten Lösung lässt sich wegen der leichten Zersetzung der Harnsäure deren Löslichkeitsgrenze nicht bestimmen.

4. Die molekulare elektrische Leitfähigkeit einer gesättigten wässerigen Harnsäurelösung beträgt bei 18° 39,28 ohne Berücksichtigung der specifischen Leitfähigkeit des zur Lösung benutzten Wassers und 32,24 nach Abzug der specifischen Leitfähigkeit desselben.

5. Die Wanderungsgeschwindigkeit des primären Harnsäure-Ions ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ions) beträgt in wässriger Lösung bei 18° 21.

6. Die molekulare Leitfähigkeit der Harnsäure in wässriger Lösung bei unendlicher Verdünnung ( $\mu_\infty$ ) beträgt bei 18° 339.

7. Die Affinitäts- oder Dissociationsconstante der Harnsäure in wässriger Lösung beträgt bei 18°  $K=0,000229$  ohne Berücksichtigung der specifischen Leitfähigkeit des zur Lösung benutzten Wassers und  $K=0,000151$  nach Abzug der specifischen Leitfähigkeit desselben.

8. In einer gesättigten wässerigen Lösung sind 11,6% (ohne Abzug des Wassers) bzw. 9,5% (nach Abzug des Wassers) der gelösten Harnsäure in Wasserstoff-Ionen (H-Ionen) und primäre Harnsäure-Ionen ( $C_5H_2N_4O_3$ -Ionen) dissociirt.

9. In 1 Liter der bei 18° gesättigten wässerigen Lösung beträgt die Concentration der Wasserstoff-Ionen (H-Ionen) und

der primären Harnsäure-Ionen ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ionen) je 0,0000175 Mol (ohne Abzug des Wassers) bzw. 0,0000143 Mol (nach Abzug des Wassers). Die Concentration der nicht dissociirten Harnsäuremolekeln beträgt 0,0001331 bzw. 0,0001363 Mol.

10. Die Angaben älterer Autoren, dass sich die Harnsäure bei längerer Berührung mit Wasser zersetzt und in Folge dessen die Löslichkeit grösser wird, konnten wir bestätigen.

11. Die mit Platinschwarz überzogenen Elektroden beschleunigen die Zersetzung der Harnsäure, und zwar in der Weise, dass die elektrische Leitfähigkeit der Lösung vermindert wird. Befindet sich feste Harnsäure als Bodenkörper in der Lösung, so wird deren Leitfähigkeit vermehrt.

Vorstehende Arbeit wurde im Laboratorium für angewandte Chemie in Leipzig begonnen und im chemischen Laboratorium in Tübingen fortgesetzt. Es ist uns eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. E. Beckmann und Herrn Prof. Dr. Freiherrn von Pechmann auch an dieser Stelle unseren Dank für das Interesse an diesen Untersuchungen auszusprechen.

---

# Beitrag zur Kenntniss der peptischen Verdauung.

Von

Dr. Hans Malfatti.

---

(Aus dem Laboratorium für medicinische Chemie, Innsbruck.)

(Der Redaction zugegangen am 28. August 1900.)

---

Das Auftreten von Produkten der tieferen Eiweiss-spaltung bei der peptischen Verdauung wurde schon sehr frühe beobachtet.<sup>1)</sup> Während aber Hoppe-Seyler die Bildung dieser Produkte der verlängerten Einwirkung des Pepsins zuschrieb, wurde später nach dem Vorgange von Kühne und Neumeister das Auftreten tryptischer Verdauungsprodukte bei der Magenverdauung auf Verunreinigung der extrahirten Magenschleimhaut bezogen.<sup>2)</sup> Die im Folgenden zu beschreibenden Beobachtungen dürften als Stütze der älteren Anschauung dienen.

Um das Auftreten tryptischer Eiweiss-spaltung nachzuweisen, diente mir die Rothfärbung mit Bromwasser. Die Versuchsanordnung war letzterhand folgende: Eine 1 %ige gut ausgekochte und wieder abgekühlte Lösung von Witte'schem Pepton wurde mit dem zu prüfenden Ferment versetzt, wenn nöthig neutralisirt oder ganz schwach angesäuert, davon je

---

<sup>1)</sup> Physiol. Chemie, Bd. II, S. 228; cf. A. Hirschler (Zeitschr. f. Physiol., Bd. II, S. 34); H. Winternitz (ibid., Bd. XVI, S. 464).

<sup>2)</sup> Auffallende Befunde, wie die von Lawrow (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 513), der Fibrin durch das Dialysat von Schweinsmageninfus verdaute und dabei beobachtete, dass fast die gesammte Eiweissmenge im Verlauf von wenigen Wochen in krystallinische Produkte übergegangen war, sind wohl sicher auf solche Verunreinigungen zurückzuführen.

5 ccm. (sammt dem etwa entstandenen Niederschlage) in 12 Eprouvetten vertheilt und durch passenden Zusatz von verdünnten Soda- bzw. Salzsäurelösungen auf einen Gehalt von 0,28, 0,16, 0,09 % kohlensauren Natrons, anderseits von 0, 0,04, 0,08, 0,11, 0,14, 0,19 und 0,22 % Salzsäure gebracht und bei Bruttemperatur hingestellt. Um Pilzentwicklung hintanzuhalten, wurde in jede Eprouvette etwas Chloroform, in Aether gelöst, gebracht. Es wird nämlich auf diese Weise die ganze Flüssigkeit gleichmässig und langsam mit dem oben aufschwimmenden Chloroform gesättigt. Beim Stehen von in gewöhnlicher Weise mit Chloroform gesättigten Lösungen in nur lose verschlossenen Gefässen kann es geschehen, dass das Chloroform aus den obersten Schichten verdampft, bevor Sterilisation eingetreten ist; ich habe in solchen Proben öfters Pilzentwicklung auftreten sehen, bei den mit Aether-Chloroform sterilisirten Proben aber kaum je einen Misserfolg gehabt.<sup>1)</sup>

Nach 2—3 Tagen wird dann der Inhalt der Eprouvetten mit Bromwasser geprüft. Man gibt das Bromwasser auch hier tropfenweise hinzu, verbraucht aber im Verhältniss zu den bei der Eiweissverdauung durch Trypsin gewöhnten Verhältnissen ziemlich viel davon, bis die Rothfärbung auftritt. Mit grösserer Bequemlichkeit und ebenso sicher kann die

---

<sup>1)</sup> Es ist übrigens für diese Versuche eine strenge Antisepsis nicht nöthig. Um nämlich die Zuverlässlichkeit der Reaction mit Brom als Zeichen für tryptische Verdauung zu prüfen, habe ich eine sehr grosse Anzahl (182) verschiedener Bacterienarten unter den hier in Betracht kommenden Bedingungen (natürlich ohne Chloroform) auf Tryptophan-Bildung geprüft. In keinem Falle konnte ich vor Ablauf des dritten Tages Bromreaction finden. Dann trat bei einigen Sarcinen (und einem Wasserbacterium aus dem Kieler Hafen) die Bromreaction auf, während nach Ablauf des vierten und fünften Tages bei ziemlich vielen Bacterienarten Tryptophan nachweisbar war. Das stimmt überein mit dem so häufig gemachten Befunde von Tryptophan in alten Bacterienculturen, hauptsächlich bei der Untersuchung von Massenculturen. Man darf wohl annehmen, dass bei den untersuchten Bacterien während des Lebens Tryptophan nicht aus Eiweiss gebildet, bzw. wieder aufgebraucht wird, dass aber aus den absterbenden Bacterien tryptisches Ferment ausgelaugt wird und dann Eiweiss spaltet.

Reaction erzeugt werden durch tropfenweisen Zusatz einer Lösung von unterchlorig- oder bromigsaurem Natron zu der angesäuerten Probeflüssigkeit.

Wenn man nun in der angegebenen Weise verschiedene Pepsinpräparate prüft, so kann man Folgendes beobachten. Nimmt man Glycerinextracte oder dialysirte Infuse von Magenschleimhaut, so tritt sehr bald Rothfärbung der alkalischen und ganz schwach sauren, bei längerer Dauer des Versuches auch der stärker sauren Proben bei Bromzusatz auf. Solche Präparate enthalten immer Trypsin.

Man kann das Trypsin zerstören, wenn man die (eiweissarmen) Präparate längere Zeit in kräftig saurer Lösung digerirt. Prüft man jetzt wieder, so tritt eine auffallende Erscheinung auf; die alkalischen und ganz schwach sauren Proben gaben keine Rothfärbung, wohl aber die Proben mit dem Säuregehalt bis zu 0,2%. Diese Tryptophanbildung kann nicht von Trypsin herrühren. In so eiweissarmen Flüssigkeiten wirkt nämlich Trypsin bei ca. 0,1% Säuregehalt nicht spaltend, zudem lassen sich die geringsten Mengen von solchen Proben absichtlich zugesetztem Pankreas-Trypsin, leicht durch die Spaltung auch der alkalischen (häufig nur der schwächer alkalischen) Proben erkennen.

Andererseits ist der entstehende Farbstoff wohl sicher als Proteinochrom anzusprechen. Er ist in Wasser unlöslich, in Alkohol löslich, zeigt das spectroskopische Verhalten des Proteinochroms, auch Schwefel konnte nach erfolgter Schmelzung mit Salpeter darin nachgewiesen werden.

Es handelt sich also um die Bildung von Tryptophan in schwach saurer Lösung durch Magenpepsin, wodurch sich dieses den bei Pflanzen, speciell bei Pilzen gefundenen peptischen Fermenten an die Seite stellen würde, oder durch ein dem Pepsin anhängendes besonderes Ferment. Die erstere — Hoppe-Seyler'sche — Ansicht, ist die wahrscheinlichere. Es gelang mir nämlich nicht, die beiden Fermente zu trennen. Bei der Reinigung des Pepsins nach Brücke bezw. Sundberg<sup>1)</sup> wird

---

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. IX, S. 319.



Pepsin getrennt, durch alle Einwirkungen aber, welche das Pepsin zerstören, wurde es gleichfalls zerstört.

Gegen diese Ansicht aber spricht, dass es sehr kräftige peptische Wirkungen gibt, ohne dass die beschriebene Bromreaction aufzufinden wäre. Zum Beispiel gibt das Grübler'sche Pepsinum sicc. puriss. manchmal keine, manchmal nur eine sehr undeutliche Bromreaction. Am auffallendsten zeigt sich dieses Verschwinden des einen Ferments, oder vielleicht besser der einen fermentativen Eigenschaft bei der Reinigung des Pepsins durch Bleifällung nach Pekelharing.<sup>1)</sup>

Um das Pepsin nach Pekelharing darzustellen, ist es zu empfehlen, die sorgfältigst filtrirte Verdauungsflüssigkeit nicht direkt zu dialysiren, sondern zuerst nach Brücke auszufällen, indem man zweckmässig zuerst nur mit Kalkmilch neutralisirt, und in der durch Decantation vom entstandenen Niederschlage, der den grössten Theil des Pepsins enthält, getrennten Flüssigkeit durch abwechselnden Zusatz von Phosphat und Chlorcalcium neue geringe Niederschläge erzeugt. Die erhaltenen Fällungen werden in Salzsäure gelöst und (nach längerem Stehen in der Brutwärme zur Zerstörung des Trypsins) filtrirt und dialysirt. Man erhält so sehr reichlich den Pekelharing'schen Pepsinniederschlag.

Man kann die Lösung dieses Pepsins wiederholt derselben Behandlung unterwerfen, ohne dass das tryptophanbildende Ferment verschwindet, wenn aber eine solche Lösung nach vorsichtiger Neutralisation mit Bleiessig und Ammoniak gefällt, dann das Ferment aus dem Bleiniederschlage durch Behandeln mit Oxalsäure, und von dieser durch Dialyse befreit wird, so ist das fragliche Ferment ganz oder bis auf Spuren verschwunden, kräftige peptische Wirkung aber noch vorhanden.

Auch der Versuch, eine Verschiedenheit der beiden Fermente dadurch zu constatiren, dass ausser dem Tryptophan auch andere krystallinische Produkte aufgesucht wurden, eine

---

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 233.

die Wahl des Pepsinpräparates (Grübner), besonders aber durch die Stärke der angewendeten Säure (0,4—0,6 %) die Tryptophanbildung hintangehalten worden war, ergab kein Resultat. In beiden Fällen traten nämlich reichlich krystallinische Produkte auf, unter denen leicht Leucin und Tyrosin und durch Phosphorwolframsäure fällbare Basen nachweisbar waren. Die letzteren liessen sich durch die Silberfällungen und Pikrinsäure nach Kossel in die Histidin-, Arginin- und eine auffallend spärliche Lysinfraktion trennen. Die Analyse der erhaltenen Produkte wird durch die Unmöglichkeit, die verhältnissmässig geringen Substanzmengen in analysenreine krystallisirte Form zu bringen, vereitelt. Uebrigens enthält, wie sich nachträglich herausstellte, auch das Witte'sche Pepton in geringer Menge dieselben Substanzen.

Ich will darum nur kurz das Verfahren angeben, nach welchem ich die krystallinischen Substanzen von den Peptonen zu trennen versuchte.

Ausser den vier von Pick<sup>1)</sup> beschriebenen Albumosenfraktionen fand sich constant in der ammoniumsulfatgesättigten schwefelsauren Lösung eine weitere von der Pick'schen Fraction IV verschiedene Albumose, die sich durch Fälln mit viel Ammoniak ausfällen lässt. Die Substanz zeichnet sich — von Pepton befreit — durch ihre relative Schwerlöslichkeit in Wasser und ihren Reichthum an locker gebundenem Schwefel aus. Die Peptone und Reste von Albumosen, welche in der salzgesättigten Flüssigkeit dann noch gelöst sind, werden durch vorsichtigen Zusatz von ganz concentrirter Eisenchloridlösung oder nach dem Vorgange von Siegfried<sup>2)</sup> mit Eisenoxydammonsulfat als isabellgelber Niederschlag ausgefällt. Die Flüssigkeit darf dabei nur ganz schwach sauer werden und wird nach dem Abfiltriren des Niederschlages nochmals mit Eisensalz und Ammoniak behandelt, um weitere Antheile der

---

1) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 246.

2) Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 335.

durch Ammoniakzusatz vom Eisen befreit; durch vorsichtiges Eindampfen bei niederer Temperatur und Auskrystallisiren lassen ein grosser Theil des Ammonsalzes entfernt. Eine weitere Menge des Ammonsulfats wird durch Zusatz von Methylalkohol weggeschafft; dieser verdient nämlich den Vorzug vor dem Aethylalkohol, weil er das Salz als Krystallpulver ausfällt und nicht Anlass zur bekannten Schichtenbildung gibt. Der Methylalkohol wird abdestillirt und aus dem Rückstand das noch vorhandene Ammoniak entfernt, indem man die Flüssigkeit in flachen Schalen bei gelinder Temperatur portionenweise mit Barytlauge versetzt, während gleichzeitig mit Hülfe eines Abzugkamins oder ähnlicher Vorrichtungen ein kräftiger Luftstrom darüber gesaugt wird. Den überschüssigen Baryt entfernt man durch Schwefelsäure und kann nun die verschiedenen Produkte in üblicher Weise zu trennen versuchen.

---

## **Die Kohlehydratgruppe des krystallisirten Ovalbumins.**

Von

**Dr. Leo Langstein** aus Wien.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 38.)

(Der Redaction zugegangen am 6. September 1900.)

---

### **I.**

Unsere Kenntnisse von den Atomgruppen, die sich an dem Aufbau der verschiedenen Eiweisskörper betheiligen, sind zum grössten Theil das Resultat von Untersuchungen, die an von der Natur in reichlicher Menge dargebotenen, jedoch nicht die Gewähr der Einheitlichkeit bietenden Rohstoffen an gestellt wurden. Und doch ist gerade die absolute Reinheit des Ausgangsmaterials eine unerlässliche Voraussetzung, sobald es sich darum handelt, aus den Produkten, die wir bei der Spaltung bestimmter Stoffe erhalten, sichere Schlüsse auf deren chemischen Aufbau zu ziehen. In diesem Sinne wird es gewiss einen Fortschritt in der Eiweisschemie bedeuten, wenn die bisher vorliegenden Untersuchungen an nachweislich reinen Eiweisssubstanzen wiederholt werden, wie wir solche derzeit in den krystallisirten pflanzlichen Globulinen, im krystallisirten Ovalbumin und Serumalbumin besitzen.

Auch die Frage nach der Kohlehydratgruppe des Ovalbumins hat deswegen eine befriedigende Lösung noch nicht gefunden, weil die Thatsache, dass das bei den betreffenden Untersuchungen verwendete Ausgangsmaterial kein einheitliches war, die Sicherheit der gefundenen Resultate beeinträchtigte. Abgesehen von der Fehlerquelle, die das dem Ovalbumin anhaftende und schwer zu beseitigende Ovomuroid

suchungen das Ausgangsmaterial bildete, ein Gemenge mehrerer Eiweisskörper, wenn auch darin das Ovalbumin beträchtlich überwiegt.<sup>1)</sup>

Ich kann hier von einer ausführlichen Besprechung der ganzen bisher vorliegenden Litteratur über die von Pavy<sup>2)</sup> neu angeregte Frage nach der Kohlehydratgruppe der Eiweisskörper umsomehr absehen, als sie vor Kurzem durch Blumenthal<sup>3)</sup> übersichtlich zusammengestellt worden ist. Ich möchte nur die neueren Angaben herausgreifen, die speciell auf die Kohlehydratgruppe des Ovalbumins Bezug haben.

C. Th. Mörner,<sup>4)</sup> welcher in dem Ovomucoid des Eierklars eine reiche Quelle reducirender und osazongebender Substanz gefunden hat, gelang es nicht, aus dem Ovalbumin Zucker abzuspalten.

Ebenso fand Spenzer,<sup>5)</sup> dass gewöhnliches, nicht weiter gereinigtes Hühnereiweiss ein Osazon liefert, wenn das Verfahren von Pavy zur Auffindung von Zucker unter den Spaltungsprodukten der Proteinstoffe angewendet wird, nicht aber das gereinigte.

Diesen negativen Ergebnissen stehen zahlreiche positive gegenüber.

Krawkow<sup>6)</sup> gelang es, aus coagulirtem und durch langdauerndes Waschen mit Wasser gereinigtem Ovalbumin nach Spaltung mit verdünnten Säuren ein Osazon zu erhalten, das er als Glukosazon anspricht.

Blumenthal<sup>7)</sup> erhielt aus durch Siedehitze coagulirtem Ovalbumin, das er nach dem Auswaschen mit Kalilauge wieder in Lösung gebracht und durch Essigsäure gefällt hatte, ein

---

1) Vgl. Schütz, diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 3.

2) Pavy, *Physiol. of the Carbohydrates*, London 1894.

3) Blumenthal, *Deutsche medicin. Wochenschrift*. 1899, S. 49—50.

4) C. Th. Mörner, *Centralbl. f. Physiol.* 1893, Bd. VII.

*Skandin. Archiv*, Bd. VI, S. 332.

5) Spenzer, *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. XXIV, S. 354.

6) Krawkow, *Pflügers Archiv*, Bd. LXV, 1897.

7) Blumenthal, *Charité-Annalen*, 1898.

Galaktosazon als auch Glukosazon sein.

Eichholz<sup>1)</sup> erhielt aus Ovalbumin, das er aus sehr verdünnter Lösung coagulirt und tagelang gewaschen hatte, das Osazon der Glykose.

Seemann,<sup>2)</sup> dem es gelang, aus dem Mucoid des Hühnereies ein Kohlehydrat abzuspalten, das er mit Glykosamin identificiren konnte, glaubt das gleiche Kohlehydrat auch aus Ovalbumin durch Spaltung erhalten zu haben; er lässt diesen Punkt jedoch unentschieden, weil er die Möglichkeit nicht auszuschliessen vermag, dass das Glykosamin von dem dem Ovalbumin noch anhaftenden Mucoid herrührt.

Ganz allein steht die Angabe von Weiss,<sup>3)</sup> der aus nach Pavy's Methode verarbeitetem Ovalbumin das Osazon der Methylpentose wie den Zucker selbst erhielt.

Hofmeister<sup>4)</sup> fand, dass das krystallisirte Eialbumin ein kohlehydratreicher Eiweisskörper ist, der beim Kochen mit verdünnten Säuren einen Theil seines Kohlehydrates abspaltet. Er schätzt aus der Menge des erhaltenen Osazons den gesammten Kohlehydratgehalt auf ca. 15%. Ueber die Natur des Kohlehydratcomplexes spricht sich Hofmeister nicht weiter aus.

Fassen wir vorliegende Angaben zusammen, so sehen wir, dass eine Einigung in der Frage nach dem Kohlehydratcomplex des Ovalbumins nichts weniger als erreicht ist.<sup>5)</sup>

---

1) Eichholz, Journal of Physiol., Bd. XXIII.

2) Seemann, Inaugur.-Dissert., Marburg 1898.

3) O. Weiss, Centralbl. f. Physiol., 1898.

4) F. Hofmeister, Ueber jodirtes Eialbum., Zeitschr. f. physiol. Chemie. Bd. XXIV.

5) Bemerkenswerth in dieser Richtung ist die Art, wie Pflüger<sup>1)</sup> die vorliegenden Thatsachen zusammenfasst.

Er bemerkt hinsichtlich der Beziehungen des Ovalbumins zu den Glykoproteinen: «Diejenige Gruppe der Glykoproteine, zu denen das Ovalbumin gehört, gilt nicht für sicher, einmal wegen unreinen Ausgangsmaterials und dann, weil das Ovalbumin aus glykosid- (ovomukoid-) haltiger Lösung auskrystallisirt worden ist, weil so zuverlässige Chemiker,

---

1) Organ. Chemie, Richter, 1900.

dem Ovalbumin abspalten lasse, überhaupt gezeugnet, andererseits herrscht bei denjenigen Autoren, denen eine solche Abspaltung gelang, keine Uebereinstimmung in der Charakterisirung des abgespaltenen Complexes.

Bei meiner Untersuchung, die eine endgiltige Klärung dieser Frage bezwecken sollte, bin ich von nach Hopkins und Pinkus<sup>1)</sup> krystallisirtem Ovalbumin ausgegangen. Durch die Eigenschaft des Ovomuroids, aus mit Ammonsulfat halbgesättigter Lösung bei Säurezusatz nicht auszufallen, ist bei wiederholtem Umkrystallisiren des Ovalbumins eine Verunreinigung damit ausgeschlossen, wie denn andererseits dieses Verhalten des Ovomuroids die reichliche Ausbeute von krystallisirtem Eiereiweiss bei der Darstellung nach dem von Hopkins und Pinkus angegebenen Verfahren erklären dürfte.

## II. Darstellung der Kohlehydratgruppe aus krystallisirtem Ovalbumin.

Die Menge des von mir verwendeten krystallisirten Ovalbumins betrug ungefähr 100 g (aus 4 l. Eierklar). Dasselbe wurde durch dreimaliges Umkrystallisiren von allen amorphen Beimengungen befreit, durch Alkohol coagulirt, sorgfältig ausgewaschen und nach Trocknung bei 110° staubfein gepulvert.

Bei der Abspaltung der Kohlehydratgruppe hielt ich mich im Wesentlichen an das von Seemann<sup>2)</sup> angegebene Verfahren.

Für Vorversuche wurden je 5 g krystallisirtes Ovalbumin nach vorhergehender Quellung in Alkali mit 100 ccm. 3%ige Salzsäure im mit Rückflusskühler versehenen Kölbchen durch mehrere Stunden auf dem Sandbad erhitzt. Nach je eine Stunde wurden der Flüssigkeit 10 ccm. entnommen und da

---

wie Mörner und Spenser, aus gereinigtem Ovalbumin kein Kohlehydrat erhalten konnten, und weil die Glykoproteine durch procentische Zusammensetzung und sonstige Reactionen mit kohlehydratfreien Eiweissstoffen vollständig übereinstimmen.»

<sup>1)</sup> Hopkins und Pinkus, Journal of Physiol., Bd. XXIII, S. 1 und Bd. XXV, S. 306.

<sup>2)</sup> Seemann, Inaugur.-Dissert., Marburg 1898.

Kohlehydratgehalt in diesen mittelst Fehling'scher Lösung bestimmt.

Die maximale Ausbeute an Kohlehydrat erhielt ich nach vierstündigem Erhitzen. Der Kohlehydratgehalt der Flüssigkeit, auf Dextrose gerechnet, betrug dann 7%. Wurde der zurückbleibende Eiweisschlamm einer nochmaligen einstündigen Säurewirkung unterworfen, konnten noch  $1\frac{1}{2}\%$  Kohlehydrat abgespalten werden. Der gut ausgewaschene Rückstand gab jedoch noch starke Kohlehydratreaction, ohne dass durch fortgesetztes Erhitzen mit verdünnter Säure eine weitere Abspaltung gelang.

Von wesentlichem Einfluss auf eine möglichst ergiebige Kohlehydratabspaltung erwies sich, wie schon Seemann bemerkte, die der Säurewirkung vorhergehende Quellung in Alkali. Meine besten Resultate erhielt ich durch eine so energische Quellung, dass das Ovalbumin zu einer Gallerte gestand.

Zur Charakterisirung des abspaltbaren Kohlehydrates wurde die Hauptmasse des Ovalbumins in Portionen von je 25 g nach vorhergehender Quellung in Kalilauge mit  $\frac{1}{2}$  Liter 3%iger Salzsäure im mit Rückflusskühler versehenen Kolben auf dem Sandbade 4—5 Stunden lang im Sieden erhalten. Dabei nahm die Flüssigkeit einen leicht gelblichen Farbenton an.

Vom ungelösten Rückstand wurde abfiltrirt und das neutralisirte Filtrat, ohne dass vorher die in Lösung befindlichen Eiweisskörper entfernt worden wären, nach Baumann<sup>1)</sup> benzoylirt.

Dabei trat nur mässige Erwärmung, auch keine Rothfärbung ein, wie sie Seemann bei seinen Benzoylirungsversuchen bemerkte. Nach Neutralisation der Benzoylirungsflüssigkeit wurde das reichlich ausgeschiedene Benzoylprodukt absitzen gelassen und durch Absaugen von der Flüssigkeit getrennt. Es wurde mit verdünntem Ammoniak und Wasser gewaschen und stellte danach eine gelblichweisse spröde Masse dar. Dieselbe wurde getrocknet, in heissem absoluten Alkohol

---

<sup>1)</sup> Baumann, Ber. XIX, S. 3218.



dem spärlichen ungelösten Rückstand wurde abfiltrirt und die heisse gelbgefärbte alkoholische Lösung auf dem Wasserbad allmählich erkalten gelassen. Dabei fiel in den ersten Stunden ein weisser amorpher Niederschlag aus, der abfiltrirt und nach Waschen mit heissem absoluten Alkohol getrennt untersucht wurde.

Er war in den meisten Lösungsmitteln unlöslich, mit Ausnahme von Eisessig, in dem er sofort zerfloss. Krystallisirt konnte ich ihn nicht erhalten. Er gab keine Biuretreaction, mit Alkali und Bleiacetat im Wasserbad erhitzt spaltete er reichlich Schwefel ab. Ich versuchte nun diesen Körper, der also den Benzoyl ester eines an locker gebundenem Schwefel sehr reichen Spaltungsproduktes des krystallisirten Ovalbumins darstellt, mit concentrirter Salzsäure im zugeschmolzenen Rohr zu spalten. Nach mehrstündigem Erhitzen bei 100° wurde erkalten gelassen, die ausgeschiedene Benzoesäure abfiltrirt, die rothbraun gefärbte Lösung mit Aether ausgeschüttelt und im Vacuum über Kalistücken eingeeengt. Aus dem zurückbleibenden schwarzbraunen Syrup krystallisirten spärliche kleine Nadeln. Eine in Wasser gelöste Probe dieses Syrups enthielt reichlich abspaltbaren Schwefel; eine andere gab mit Nitroprussidkalium eine moosgrüne, sofort verschwindende Farbenreaction, die Cysteinreaction mit Eisenchlorid fiel negativ aus. Zu einer Analyse reichte mein Material nicht.

Die nach Abfiltriren des eben besprochenen Körpers erhaltene klare alkoholische Lösung trübte sich nach ca. 12 Stunden neuerdings, und es fielen makroskopisch gut wahrnehmbare seidenglänzende Nadeln aus, die stellenweise federbuschartig angeordnet waren, untermischt mit spärlichen amorphen Krümel. Nach ungefähr drei Tagen war die Abscheidung der Krystalle beendet. Sie wurden durch Absaugen von der Mutterlauge befreit. Die Trennung derselben von dem mitausgefallenen amorphen Niederschlag gelang nur schwer. Durch tagelange Extraction mit kaltem absoluten Alkohol, in dem sich die Nadeln, obgleich schwer, lösten, nicht aber der amorphe Körper, kam ich, wenn auch unter Verlusten, zum Ziel. Die alkoholische Lösung der Krystalle wurde an der Luft verdunsten gelassen, wobei sich ca.  $\frac{1}{2}$  cm. lange weiße seidenglänzende Nadeln ausschieden.

Der Schmelzpunkt derselben ergab sich zu 202—203°.

Der Stickstoffgehalt, an einer kleinen Menge Substanz (0,0312 g) nach Kjeldahl bestimmt, betrug 1,962%. Dieses Verhalten erlaubt den Schluss, dass Pentabenzoylglykosamin vorliegt. Für dasselbe fand Pum<sup>1)</sup> nach wiederholtem Umkrystallisiren aus heissem Alkohol einen Schmelzpunkt von 203° und einen Stickstoffgehalt von 2,00%.

Ich versuchte nun, dem Verfahren von Seemann folgend, aus den Mutterlaugen den Zucker selbst abzuspalten. Die alkoholische Mutterlauge wurde in grosse Mengen destillirten Wassers gegossen, wobei sich das Benzoylprodukt zuerst in weissen Flocken absetzte, jedoch bald körnig wurde. Es wurde abfiltrirt, mit heissem Wasser gewaschen und im zugeschmolzenen Rohr mit Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,1 durch 24 Stunden auf 100° erhitzt. Nach dem Erkalten wurde von der in der gelbgefärbten Salzsäure massenhaft ausgeschiedenen Benzoessäure abfiltrirt, und die Salzsäure, nachdem sie mit Aether energisch ausgeschüttelt worden war, bei ca. 60° abgeraucht. Aus dem zurückbleibenden braunen Syrup krystallisirte neben geringen Mengen Kochsalz und langen Nadeln (Gyps?) ein Körper, Anfangs in Sphenoiden, später in rhombischen Platten. Der braune Syrup wurde in absolutem Alkohol gelöst und von den ungelösten Krystallen abfiltrirt. Diese wurden aus salzsäurehaltigem Wasser umkrystallisirt, wobei sie mehrere Millimeter im Durchmesser erreichten.

Dieselben boten jedoch, wie eine von Herrn Prof. Bruhns am hiesigen mineralogischen Institut vorgenommene Untersuchung lehrte, nicht die aus Ledderhose's<sup>2)</sup> Arbeit über Glykosamin bekannten charakteristischen Formen dar, zeigten vorwiegend Zwillingsformen und, soweit dies untersucht werden konnte, ein abweichendes optisches Verhalten.

War somit auf diesem Wege eine Identification meiner Krystalle mit salzsaurem Glykosamin nicht möglich, so gelang sie doch auf dem Wege der Analyse:

---

1) Pum, Ueber d. Benzoessäureester des Glykosamins, Monatshefte f. Chemie, Bd. XII.

2) Ledderhose, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 142.

	gefunden	Berechnet
0,1166 g Substanz enthielten	33,51 % C	33,34 % C
	6,53 % H	6,49 % H
0,113 g Substanz enthielten	6,38 % N	6,49 % N

Es kann demnach an der Identität der gefundenen Krystalle mit salzsaurem Glykosamin kein Zweifel bestehen.

Aus dem abweichenden krystallographischen Verhalten weitere Schlüsse zu ziehen, etwa auf ein stereoisomeres Glykosamin, wäre verfrüht; für eine Untersuchung des optischen Verhaltens der Krystalle reichte mein Material nicht.

Aus meiner Untersuchung geht demnach unzweifelhaft hervor, dass das Glykosamin am Aufbau des krystallisirten Ovalbumins theilhaftig ist.

Die Frage, ob es den einzigen Kohlehydratcomplex darin darstellt, ist damit freilich nicht entschieden. Da jedoch andere benzoylirte Kohlehydrate nicht aufzufinden sind, so scheint mir diese Auffassung zur Zeit die am meisten berechnigte. Berechnet man auf Grund des für das gespaltene Eiweiss gefundenen Reductionsvermögens den vermeintlichen Gehalt an Glykosamin, so ergibt sich etwa 10—11 %, <sup>1)</sup> wobei noch zu berücksichtigen ist, dass eine ganz befriedigende Abspaltung des Glykosamins durch Säure nicht zu erzielen ist.

In dieser Richtung ist bemerkenswerth, dass es mir weder durch Spaltung von krystallisirtem Ovalbumin mit concentrirter Salzsäure, noch mit concentrirter Salzsäure und Zinnchlorür (30 g Zinnchlorür auf 50 ccm. Salzsäure) gelang, aus dem Eiweiss Kohlehydrat zu erhalten. Bei Spaltung mit concentrirter Salzsäure trat reichliche Melaninbildung auf, bei Anwesenheit von Zinnchlorür blieb die Flüssigkeit klar (sie zeigte nur einen röthlichen Farbenton), gab jedoch hinterher nicht die Spur einer Molisch'schen Reaction.

<sup>1)</sup> Nach Ledderhose<sup>1)</sup> sind zur Reduction von 1 ccm. Fehling'scher Lösung 5.986 mg salzsaures Glykosamin erforderlich; nach meiner Berechnung 6,003 mg.

<sup>1)</sup> Ledderhose, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 146.

wurden folgende Versuche angestellt:

I. Erhitzen von salzsaurem Glykosamin mit concentrirter Salzsäure mehrere Stunden lang auf dem Sandbade.

II. Mehrstündiges Erhitzen von salzsaurem Glykosamin mit concentrirter Salzsäure unter Zusatz von Zinnchlorür.

III. Mehrstündiges Erhitzen von salzsaurem Glykosamin unter Zusatz von Chlorammonium.

Im ersten Versuch bräunte sich die Lösung, doch blieb das Glykosamin sicher zum grössten Theil unverändert.

Im zweiten Versuch blieb die Salzsäure farblos und das Glykosamin unverändert.

Im dritten Versuch färbte sich die Salzsäure bald dunkel-schwarz unter reichlicher körniger Abscheidung eines schwarz gefärbten Produktes.

Nach diesem Ergebniss ist für die negativen Resultate der Versuche, aus Ovalbumin durch concentrirte Säure Kohlehydrat abzuspalten, die Erklärung dadurch gegeben, dass es das durch starke Säure aus dem Eiweiss abgespaltene Ammoniak ist, welches die Reaction in einem anderen Sinne verlaufen lässt, bei Einwirkung von concentrirter Säure allein unter Bildung schwarzgefärbter, bei gleichzeitiger Anwesenheit von Zinnchlorür unter Bildung farbloser Produkte.

Meine Untersuchung über die Kohlehydratgruppe der Eiweisskörper gedenke ich auf das krystallisirte Serumalbumin auszudehnen und werde seinerzeit darüber berichten.

---

# Ueber einige Bedingungen der Ptyalinwirkung.

Von

Dr. T. Maszewski.

---

(Aus dem Laboratorium des Wola-Krankenhauses zu Warschau.)

(Der Redaction zugegangen am 7. September 1900.)

---

Obwohl man schon von vielen Seiten die Bedingungen der Fermentwirkung im Allgemeinen und der Wirkung der Verdauungsenzyme im Speciellen untersucht hat, so dass die Frage für einigermaassen abgeschlossen angesehen werden könnte, so mehren sich doch andererseits in der Litteratur die Hinweise, dass sich in dieser Richtung neue Gebiete für die Untersuchung eröffnen. Unter Anderen ist neuerdings Bier-nacki<sup>1)</sup> bei seinen Beobachtungen über das glykolytische Ferment des Blutes zu einigen unerwarteten Ergebnissen gelangt. Da nun das glykolytische Ferment, beziehungsweise die gegenwärtig so viel besprochenen «Oxydationsfermente» mit den Verdauungsfermenten viel Gemeinsames besitzen sollen, so erschien es mir wünschenswerth, zu erfahren, ob die in Bezug auf das glykolytische Enzym festgestellten Thatsachen auch bei den Verdauungsfermenten wiedergefunden werden können. In erster Linie interessirte mich hierbei das Ptyalin, welches unter den Verdauungsfermenten dem glykolytischen Ferment des Blutes an die Seite gestellt werden darf.

Folgende Fragen waren in Bezug auf das Ptyalin zu beantworten: 1. kann eine Menge dieses Enzyms nur eine bestimmte, unter allen Umständen gleiche Zuckermenge produ-

---

1) Beobachtungen über die Glykolyse in pathologischen Zuständen. Pamieln. Tow. Lek. in Warschau, 1898.

ciren, oder ist im Gegentheil die saccharificirende Kraft des Ptyalins keine absolute, sondern nur eine relative, und hängt sie von der Stärkeconcentration, bezüglich absoluten Mengen von Stärke, vom Volumen der Ptyalinstärkemischungen und dergleichen ab? 2. Was für quantitative Beziehungen existiren zwischen der Menge des Enzyms und der gebildeten Zuckermenge?

Die Versuche stellte ich meistens mit meinem eigenen Speichel an, welcher zwischen 11—12 Uhr Morgens oder 4—5 Uhr Nachmittags gesammelt und unmittelbar vor dem Verwenden filtrirt wurde. Zu je einer Versuchsreihe gebrauchte ich die zeitlich gleiche Speichelportion, und in allen Experimenten dieselbe Stärkesorte, von welcher ein gleichmässiger Kleister immer frisch zubereitet wurde. Die Versuche fanden bei Zimmertemperatur (14—15°) statt und dauerten 24 Stunden, worauf die Fermentation mittelst Aufkochens abgebrochen wurde. Um die Nebengährungen zu vermeiden, versetzte ich die Stärkekleister-Ptyalingemische mit einem Krystall Thymol. Die gebildete Zuckerquantität wurde mittelst Knapp'scher Lösung bestimmt, die Endreaction mit gesättigtem Ammoniumsulfat.

Meine Experimente bilden drei Serien, welche durch die Buchstaben A, B, C bezeichnet sind. Die an demselben Tage angestellten parallelen Versuchsreihen sind durch römische Ziffern, die einzelnen Bestimmungen durch arabische bezeichnet.

In der Serie A wurden in allen Versuchen gleiche Speichelmengen (1 ccm.) und gleiche Stärkekleistervolumina (50 ccm.) angewendet, indem die Stärkeconcentration, d. h. die absoluten Stärkemengen jedesmal wechselten. Es wurde nun nach 24 Stunden aufgefunden in:

I. Versuchsreihe:

- |    |         |                     |              |           |                 |
|----|---------|---------------------|--------------|-----------|-----------------|
| 1) | 50 ccm. | $\frac{1}{8}$ %iger | Stärkelösung | . . . . . | 0,125 g Zucker. |
| 2) | 50      | > 1                 | >            | . . . . . | 0,219 g >       |
| 3) | 50      | > 2                 | >            | . . . . . | 0,433 g >       |

II. Versuchsreihe:

- |    |         |         |              |           |                 |
|----|---------|---------|--------------|-----------|-----------------|
| 4) | 50 ccm. | 1 %iger | Stärkelösung | . . . . . | 0,219 g Zucker. |
| 5) | 50      | > 2     | >            | . . . . . | 0,431 g >       |
| 6) | 50      | > 4     | >            | . . . . . | 0,833 g >       |

Stärke . . . . .	0,271 g Zucker.
„ . . . . .	0,462 „
„ . . . . .	0,502 „

Speichel- (Enzym-) Mengen nahm  
 r Stärkeconcentration (Stärke-  
 ung auch zu, aber nicht etwa in  
 s ist besonders aus der dritten Ver-

gleiche Mengen Speichel (1 ccm.)  
 5 g, 1 g, 2 g) zur Verwendung,  
 mina ungleich.

chsreihe:

rgaben . . . .	0,195 g Zucker.
„ . . . .	0,235 „
„ . . . .	0,390 „
„ . . . .	0,403 „

eihe:

en . . . .	0,132 g Zucker.
„ . . . .	0,156 „
„ . . . .	0,231 „
„ . . . .	0,304 „
„ . . . .	0,446 „
„ . . . .	0,403 „
„ . . . .	0,641 „

„ . .	0,833 g Zucker.
„ . .	0,862 „
„ . .	0,806 „

0,446 g Zucker.
0,416 „
0,500 „
277 „

6 g Zucker.
7 „
„
„

IX. Versuchsreihe:

32)	25 ccm.	+	2 g Stärke	ergaben . . . .	0,714 g Zucker.
33)	50	+	2	„ „ „ . . . .	0,735 „
34)	100	+	2	„ „ „ . . . .	0,892 „
35)	200	+	2	„ „ „ . . . .	0,675 „

In der obigen Serie findet sich zunächst eine Bestätigung der in der Serie A gewonnenen Resultate; ausserdem aber ist zu ersehen, dass trotz gleicher Speichel- und Stärkemengen die Zuckerproduktion bei zunehmender Verdünnung der Stärke, mit anderen Worten, bei zunehmenden Lösungsvolumina auch zunehmen kann, wobei aber kein direktes Verhältniss zwischen beiden Grössen wahrzunehmen ist. Die Steigerung der Zuckerproduktion findet jedoch nur bis zu einem gewissen Grade der Stärkeverdünnung statt, bei weiterer Verdünnung kann eine bedeutende Schwächung des saccharificirenden Vermögens eintreten. — So sinkt z. B. in der VI. Versuchsreihe mit 2 g Stärke bei 200 ccm. Lösung die Zuckermenge ganz deutlich (auf 0,806 g), während sie bei 50 ccm. 0,833 g und bei 100 ccm. das Meiste, 0,862 g, betrug. In der VII. Reihe, mit 1 g Stärke, ist die Herabsetzung der Saccharification bei 200 ccm. noch ausgesprochener: auf 0,277 g, gegen 0,500 g bei 100 ccm. Dasselbe war in der IX. Versuchsreihe der Fall, während in der VIII. mit 1 g Stärke die stärkste Zuckerbildung bei 50 ccm. stattgefunden hatte.

Diese Versuchsergebnisse kann man dahin zusammenfassen, dass bei bestimmten Speichel- und Stärkemengen ein bestimmter Concentrationsgrad der Stärke nöthig ist, um die maximale Zuckerbildung zu ermöglichen. In den angeführten Experimenten war nun die günstigste Stärkeverdünnung in Bezug 1 ccm. Speichel: 2 g in 100 ccm., wobei die grössten Zuckermengen gebildet wurden.

In der dritten Serie C waren die Stärkemengen und deren Concentration gleich; es schwankte nur das Speichelvolumen:

X. Versuchsreihe:

36)	54 ccm.	— 1,9 %iger Stärkelös.	+	1 ccm. Speichel	0,450 g Zucker.
37)	54	„ — 1,9 „	+	2 „	0,435 „
38)	54	„ — 1,9 „	+	3 „	0,482 „
39)	54	„ — 1,9 „	+	3 „	0,450 „



40)	50	ccm. einer 2%igen Stärkelös.	+ $\frac{1}{4}$ ccm. Speichel	— 0,462 g Zucker.
41)	50	„ „ 2 „ „	+ $\frac{1}{2}$ „ „	— 0,378 „ „
42)	50	„ „ 2 „ „	+ 1 „ „	— 0,520 „ „
43)	50	„ „ 2 „ „	+ 2 „ „	— 0,403 „ „

#### XII. Versuchsreihe:

44)	50	ccm. einer 2%igen Stärkelös.	+ $\frac{1}{4}$ ccm. Speichel	— 0,520 g Zucker.
45)	50	„ „ 2 „ „	+ 23 „ „	— 0,595 „ „

#### XIII. Versuchsreihe:

46)	50	ccm. einer 2%igen Stärkelös.	+ $\frac{1}{4}$ ccm. Speichel	— 0,500 g Zucker.
47)	50	„ „ 2 „ „	+ 30 „ „	— 0,520 „ „

In dieser Serie fallen höchst bemerkenswerthe Erscheinungen auf: bei constanten Stärkemengen und constanten Concentration an Stärke bewirkte die Zunahme der Enzymmenge meistens gar keine Zunahme, mitunter eher eine Abnahme der Zuckerproduktion. Besonders fallen in dieser Hinsicht die Versuchsreihen XII und XIII auf, wo bei 23 und 30 ccm. Speichel nur sehr unbedeutend mehr Zucker, als bei  $\frac{1}{4}$  ccm. (also einer 90 bis 120 Mal geringeren Quantität), im Gemische gefunden worden ist. In der Reihe XI war bei 2 ccm. die Saccharification schon entschieden schwächer als bei 1 ccm.

Die Ergebnisse der Versuche 45 und 47 (mit 23 und 30 ccm. Speichel) lenken die Aufmerksamkeit um so mehr auf sich, als hierbei durch den Zusatz von grösseren Speichelmengen das Volumen der Gemische gegen andere bedeutend vergrössert wurde. Im Einklang mit den Resultaten der Serie B könnte man nun erwarten, dass durch die Steigerung der Verdünnung an sich die Saccharification sich steigern würde. Es entsteht also die Frage, ob die geringen Ueberschüsse von 0,020—0,075 g Zucker gegen  $\frac{1}{4}$  ccm. Enzym ganz einfach nicht durch eben dieses Agens herbeigeführt sind.

Mögen die obigen Resultate höchst merkwürdig erscheinen, so ist doch absolut dasselbe von Biernacki<sup>1)</sup> in Bezug auf das glykolytische Ferment beobachtet worden. Unter 12 Ver-

---

<sup>1)</sup> loc. cit.

suchen fiel bei ihm nur einmal bei Anwendung von 3 ccm. bis 5 ccm. Blut gegen gewöhnliche 1 ccm. die Zuckeroxydation stärker aus. Dagegen kamen bei gewissen Blutmengen am meisten schwächere Zuckerverluste vor, als bei 1 ccm. In zwei Experimenten z. B. oxydirten 0,5 ccm. mehr Zucker als 1 ccm.

Auch bezüglich der Verhältnisse zwischen der Grösse der Zuckeroxydation und der Zuckerconcentration in der Lösung wurde von diesem Verfasser Aehnliches festgestellt, wie von mir. Bei Steigerung der Zuckerconcentration nahm die Glykolyse absolut zu, wenn sie auch bei gewissen Zuckerwerthen procentisch abzunehmen begann. Eine absolute Abnahme beobachtete Biernacki unter diesen Bedingungen (gegen unsere Erfahrungen) nicht, wahrscheinlich deswegen, weil er nur mit gewissen Concentrationsgraden (bis 5 % Glykose) experimentirte. Endlich stellte er auch den Einfluss des Lösungsvolumens auf die Energie der Glykolyse fest.

Höchst wahrscheinlich wiederholen sich alle diese That- sachen bei sonstigen Verdauungsenzymen. Ohne auf weitere Schlussfolgerungen eingehen zu wollen, möchten wir nur auf einen Umstand hinweisen: Wie problematischen Werthes erweisen sich alle modernen Methoden der quantitativen Enzymbestimmung im Lichte der mit Ptyalin gewonnenen Erfahrungen! Man schliesst auf die Menge des Ferments aus der Menge seines specifischen Produktes. Und doch wurden, um dies noch einmal zu wieder- holen, in unseren Experimenten gleiche Zuckermengen unter gleichen Versuchsbedingungen ebenso gut durch eine Ptyalin- einheit, wie durch eine 90—100 Mal grössere geliefert. Wenn nun dasselbe z. B. mit dem Pepsin der Fall ist, so brauchen wir nicht näher auseinander zu setzen, was für einen Werth die vielen Arbeiten beanspruchen können, welche sich mit den quantitativen Schwankungen der Pepsinmenge bei pathologischer Magenverdauung befassen.

Herrn Dr. E. Biernacki sage ich für die Anregung und Unterstützung bei dieser Arbeit meinen besten Dank.

---

# **Physikalisch-chemische Untersuchungen über das Verhalten der Harnsäure und ihrer Salze in Lösungen.**

Von

**Dr. Wilhelm His jun., a. o. Professor an der Universität Leipzig**  
und

**Dr. Theodor Paul, a. o. Professor an der Universität Tübingen.**

---

(Der Redaction zugegangen am 9. September 1900.)

---

## **2. Abhandlung: Die vermeintliche Leichtlöslichkeit der Harnsäure in wässerigen Lösungen starker Säuren.**

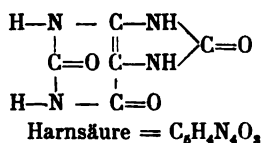
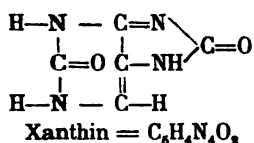
(Inhaltsangabe: 1. Theoretisches: Das Verhalten von Harnsäurederivaten als amphotere Elektrolyte. — Die Anwendung der Theorie von der elektrolytischen Dissociation auf das Verhalten der Harnsäure in wässerigen Lösungen starker Säuren. 2. Löslichkeitsversuche: Löslichkeit der Harnsäure in normaler Salzsäure und Schwefelsäure. — Löslichkeit der Harnsäure in ca. 4- und 6fach normaler Salzsäure und Schwefelsäure. 3. Schlussfolgerungen.)

### **1. Theoretisches.**

In der Litteratur findet sich öfters die Angabe, dass Harnsäure in verdünnter Salzsäure leichter löslich sei, als in Wasser. Diese Angabe scheint sich auf eine ältere Untersuchung zu stützen, welche aufzufinden uns nicht gelungen ist; sie findet sich, ohne Citat, in Fehling's Handwörterbuch der Chemie (1878, Band III, S. 584), in Ladenburg's Handwörterbuch (1893, Band V, S. 7); neuere Autoren, z. B. Rüdel (Arch. für experimentelle Pathologie Band XXX) und Smale (Centralblatt für Physiologie Band IX, Nr. 12), nehmen sie als erwiesen an, ohne Quellen anzugeben. Dagegen fehlt die Angabe in dem älteren Handwörterbuch der Chemie von Liebig, Poggendorf und Wöhler (1848), in Berzelius-Wöhler's Lehrbuch der Chemie (1840) sowie in den neueren Lehr-

und Handbüchern von Beilstein, Bunge, Neumeister, Hammarsten und Hoppe-Seyler. Zabelin [Annalen der Chemie und Pharm., Supplement II, S. 313 (1863)] sagt ausdrücklich, dass ein Gehalt des Wassers an Salzsäure auf das Lösungsvermögen für Harnsäure keinen Einfluss habe.

Von vornherein erscheint die grössere Löslichkeit der Harnsäure in wässerigen Mineralsäuren nicht unwahrscheinlich, weil sie sich auf die Analogie mit nahe verwandten Körpern, Xanthin, Guanin, Theobromin, stützt. Von diesen Verbindungen wissen wir, dass sie sich starken Säuren gegenüber wie schwache Basen und zu starken Basen wie schwache Säuren verhalten, dass sie also als negative Anionen auftretend positive Wasserstoff-Ionen und als positive Kationen negative Hydroxyl-Ionen (OH-Ionen) zu bilden vermögen. Die Gleichgewichte, welche in den wässerigen Lösungen solcher Stoffe auftreten, sind von Georg Bredig<sup>1)</sup> näher untersucht worden; er nannte derartige Körper, welche gleichzeitig sowohl saure, wie basische Natur zeigen können, amphotere Elektrolyte. Betrachten wir z. B. das Xanthin  $C_5H_4N_4O_2$ , dessen chemisches Verhalten allgemein durch nachstehende Constitutionsformel ausgedrückt und dessen Verwandtschaft mit Harnsäure, durch die daneben gesetzte Formel derselben veranschaulicht wird.



Einmal geht die elektrolytische Dissociation in der Weise vor sich, dass positive Wasserstoff-Ionen und negative  $C_5H_3N_4O_3$ -Ionen gebildet werden, d. h. das Xanthin functionirt als Säure. Da indessen die Concentration der H-Ionen nur sehr gering ist, sind die Salze sehr stark hydrolytisch gespalten; eine wirkliche Salzbildung, d. h. die Bildung einer grösseren Menge negativer  $C_5H_3N_4O_3$ -Ionen kommt nur dann zu Stande, wenn durch einen starken Ueberschuss von Lauge die Dissociation

1) G. Bredig, Ueber amphotere Elektrolyte und innere Salze. Zeitschrift für Elektrochemie 6, 33 (1899).

liegen hier ähnlich wie bei den in unserer ersten Abhandlung erwähnten secundären harnsauren Salzen, welche ebenfalls nur in stark alkalischer Lösung zu existiren vermögen. Die Bildung von negativen Hydroxyl-Ionen ( $\text{OH}^-$ -Ionen) geht wahrscheinlich in derselben Weise wie beim Ammoniak  $\text{NH}_3$  vor sich, welches in wässriger Lösung durch Anlagerung von  $\text{H}_2\text{O}$  und durch die Umwandlung des dreiwerthigen Stickstoffs in den fünfwerthigen, in Ammoniumhydroxyd  $\text{NH}_4\text{OH}$  übergeht, das theilweise in positive Ammonium-Ionen ( $\text{NH}_4^+$ -Ionen) und negative Hydroxyl-Ionen ( $\text{OH}^-$ -Ionen) dissociirt ist. Analog würde die Stickstoffbase Xanthin  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$  durch Anlagerung von  $\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{OH}$  übergehen, dessen Ionen das positive  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{O}_2^+$ -Ion und das negative Hydroxyl-Ion ( $\text{OH}^-$ -Ion) sind. Die Concentration der Hydroxyl-Ionen ( $\text{OH}^-$ -Ionen) kann auch hier nur sehr gering sein, infolgedessen sind die Salze des Xanthins mit den Säuren ebenfalls stark hydrolytisch gespalten und die Bildung einer grösseren Menge positiver  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{O}_2^+$ -Ionen erfolgt nur bei Gegenwart eines grösseren Ueberschusses starker Säuren.

Da die Zusammensetzung der Harnsäure der des Xanthins so ähnlich ist, liegt der Schluss nahe, dass auch die Harnsäure starken Säuren gegenüber die Rolle einer schwachen Base zu spielen und positive Ionen zu bilden vermag. Die Entscheidung dieser Frage hat sowohl vom praktischen, wie auch vom theoretischen Standpunkt aus einiges Interesse, da bei der Bestimmung der Harnsäure im Harn und in ihren Salzen, die vielfach durch die Abscheidung derselben mittelst überschüssiger Salzsäure oder Schwefelsäure geschieht, und bei der Berechnung des chemischen Gleichgewichtes in solchen Gemischen das Auftreten eines positiven Ions wegen der damit verbundenen Verschiebung der Löslichkeitsverhältnisse von grossem Einfluss sein würde. Die Thatsache, dass sich die Harnsäure in concentrirter Schwefelsäure ohne Zersetzung

---

1) Die Bildung negativer Xanthin-Ionen kann auch durch Dissociation des Hydrates  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{OH}$  in negative  $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2 \cdot \text{OH}^-$ -Ionen und positive H-Ionen vor sich gehen.

in grosser Menge lost und dass sogar krystallinische Verbindungen von Harnsäure mit Schwefelsäure gewonnen wurden,<sup>1)</sup> kann hier nicht zur Entscheidung herangezogen werden, da in diesen Fällen das Wasser nicht als Lösungsmittel functionirt. Der Umstand, dass sich die Harnsäure nach Zusatz von Wasser zur Lösung in Schwefelsäure wieder abscheidet, spricht eher zu Gunsten der Ansicht, dass die Harnsäure nicht als Base zu functioniren vermag.

Ehe wir zu unseren Löslichkeitsversuchen übergehen, wollen wir unter Zugrundelegung der in unserer ersten Abhandlung dargelegten theoretischen Betrachtungen die Frage erörtern: Wie verhält sich eine gesättigte wässerige Harnsäurelösung bei Zusatz starker Säuren und unter der durch das Experiment bestätigten Voraussetzung, dass die Harnsäure nicht als Base zu functioniren vermag? Eine wässerige Harnsäurelösung enthält, wie wir gesehen haben, nicht dissociirte Harnsäuremolekeln, primäre Harnsäure-Ionen ( $C_5H_3N_4O_3$ -Ionen) und Wasserstoff-Ionen. Die Gesamtmenge der in 1 Liter bei 18° gesättigter Lösung enthaltenen Harnsäure beträgt 0,0253 g = 0,0001506 Mol, wovon nach den unter Abzug der specifischen elektrischen Leitfähigkeit des zur Lösung benutzten Wassers angestellten Berechnungen 0,0001363 Mol auf die nicht dissociirten Harnsäuremolekeln und je 0,0000143 Mol auf die primären Harnsäure-Ionen und Wasserstoff-Ionen entfallen. Bezeichnen wir die Concentration der primären Harnsäure-Ionen mit a, die der Wasserstoff-Ionen mit b und die der nicht dissociirten Harnsäuremolekeln mit c, so besteht nach dem oben erwähnten Gesetz, dass das Produkt der Concentrationen der Ionen eines binären Elektrolyten gleich der Concentration des nicht dissociirten Antheils, multiplicirt mit einer Constanten ist, die Gleichung:

$$a \cdot b = c \cdot k, \quad (1)$$

in welcher k die Affinitäts- oder Dissociationsconstante der

---

1) Fritzsche citirt in *Annalen der Chemie und Pharm.* 28, 332 (1838); *Journal für pract. Chemie* 14, 243; Löwe, *Journal für pract. Chemie*, 97, S. 108 und *Zeitschr. f. Chemie* IX, S. 249 (1866); Dessaignes, *Jahresber. über d. Fortschr. d. Chemie* 1854, S. 469.

diese Beziehungen thatsächlich bestehen, wollen wir die uns bekannten Werthe in die Gleichung einsetzen. Da man unter Concentration den Quotienten aus der absoluten Menge und dem Volumen versteht, so ist die Concentration der Harnsäure in der gesättigten wässerigen Lösung, welche in einem Liter 0,0001506 Mol enthält  $= \frac{0,0001506}{1} = 0,0001506$ . Die

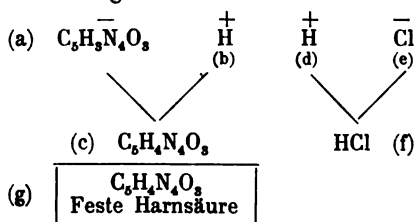
Concentration der primären Harnsäure-Ionen und der Wasserstoff-Ionen ist demnach je 0,0000143 und die des nicht dissociirten Antheils der Säure 0,0001363. Die Affinitätsconstante  $k$  war nach den in der ersten Abhandlung angestellten Berechnungen nach Abzug der specifischen Leitfähigkeit des Wassers  $= 0,00000151$ . Setzen wir diese Werthe ein, so erhalten wir die Gleichung:

$$\begin{aligned} 0,0000143^2 &= 0,0001363 \times 0,00000151 \\ 205 \cdot 10^{-12} &= 206 \cdot 10^{-12} \end{aligned}$$

Wir sehen also, dass, abgesehen von einer kleinen Differenz, die durch das Abrunden obiger Zahlen entstanden ist, die Gleichung erfüllt wird.

Setzen wir nun zu dieser gesättigten wässerigen Harnsäurelösung eine starke Säure, wie z. B. Salzsäure, so bringen wir damit Wasserstoff-Ionen, Chlor-Ionen und nicht dissociirte Chlorwasserstoffmolekeln in dieselbe. Der Zustand dieses Gemisches lässt sich durch nachstehendes Schema veranschaulichen.

Schema für den Zustand einer gesättigten wässerigen Harnsäurelösung nach Zusatz von Salzsäure.



In diesem Schema entsprechen die Buchstaben den Concentrationen folgender Stoffe:

a = Concentration der primären Harnsäure-Ionen,  
b = „ „ Wasserstoff-Ionen der Harnsäure,

d =	›	›	Wasserstoff-Ionen der Salzsäure,
e =	›	›	Chlor-Ionen der Salzsäure,
f =	›	›	nicht dissociirten Salzsäuremolekeln.

g bedeutet die ausgeschiedene Harnsäure, welche am Gleichgewicht in der gesättigten Lösung als Bodenkörper nicht mit ihrer ganzen Masse Theil nimmt.

Die Salzsäure gehört zu den stärksten Säuren und deshalb ist sie auch in grösserer Concentration weitgehend in Wasserstoff-Ionen und Chlor-Ionen dissociirt. Um bei einem concreten von uns experimentell untersuchten Beispiel zu bleiben, wollen wir annehmen, dass einem Liter der Lösung 36,5 g Chlorwasserstoff zugesetzt wurde, die Concentration desselben demnach = 1 sei. Den Dissociationsgrad einer solchen «normalen» wässerigen Salzsäure können wir mit einer für den vorliegenden Zweck vollkommen genügenden Genauigkeit aus der elektrischen Leitfähigkeit derselben berechnen. Wir machen dabei die Annahme, dass die elektrische Leitfähigkeit dem Dissociationsgrad dieses binären Elektrolyten proportional ist. Nach F. Kohlrausch beträgt die molekulare elektrische Leitfähigkeit der normalen = 1 litrigen wässerigen Salzsäure bei 18° 301<sup>1)</sup> und diejenige bei unendlicher Verdünnung, welche sich additiv aus den Wanderungsgeschwindigkeiten des Wasserstoff-Ions = 318 und des Chlor-Ions = 66 zusammensetzt, = 384.<sup>2)</sup> Da die Dissociation der Salzsäure bei unendlicher Verdünnung praktisch als vollständig angesehen, der Dissociationsgrad also = 1 gesetzt werden kann, beträgt derjenige in 1 litriger Lösung  $\frac{301}{384} = 0,78$ , oder mit anderen Worten in einer 1 litrigen Lösung ist die Salzsäure zu 78 Procent in positive Wasserstoff-Ionen und negative Chlor-Ionen dissociirt. Die Concentration dieser Ionen beträgt demnach je 0,78. Vergleichen wir hiermit die Concentration der Wasserstoff-Ionen, welche von der Harnsäure abgespalten werden und 0,0000143 beträgt, so sehen

<sup>1)</sup> F. Kohlrausch und L. Holborn, Das Leitvermögen der Elektrolyte. Leipzig 1898. Seite 160.

<sup>2)</sup> Ibid., Seite 200.



concentration der Wasserstoff-Ionen in der Lösung durch den Zusatz der Salzsäure erfahren hat. Aber auch unter diesen Verhältnissen muss die Gleichung

$$a \cdot b = c \cdot k, \quad (1)$$

welche die Beziehungen zwischen dissociirtem und nicht dissociirtem Antheil der Harnsäure regelt, zu Recht bestehen und wir sehen an diesem Beispiel so recht die Bedeutung der von W. Ostwald eingeführten Dissociationsconstanten. Da die linke Seite der Gleichung das Produkt aus primären Harnsäure-Ionen und Wasserstoff-Ionen darstellt und die Concentration der letzteren durch den Salzsäurezusatz um  $d$  vermehrt worden ist, muss die Gleichung (1) jetzt lauten:

$$a \cdot (b + d) = c \cdot k. \quad (2)$$

In beiden Gleichungen hat die rechte Seite  $c \cdot k$  denselben Werth, da  $c$ , die Concentration des nicht dissociirten Antheils der gelösten Harnsäure, in gesättigten Lösungen eine unveränderliche Grösse und  $k$  eine Constante ist. Die Gleichung (2) kann demnach nur dann erfüllt werden, wenn die Concentrationen  $a$  und  $b$  andere Werthe annehmen, d. h. der Dissociationsgrad der Harnsäure muss durch den Zusatz der Salzsäure eine Aenderung erleiden. Dies ist thatsächlich der Fall und wir wollen nun feststellen, welcher Art diese Aenderung ist.

Es ist  $a = b$  und  $d$  im Verhältniss zu diesen Concentrationen, wie wir gesehen haben, ausserordentlich gross, folglich kann das Produkt  $a \cdot (b + d)$  nur dann denselben Werth beibehalten, wenn der Factor  $a$  entsprechend klein wird. Lösen wir die Gleichung

$$a \cdot (b + d) = c \cdot k$$

oder, da  $a = b$  ist,  $a \cdot (a + d) = c \cdot k$  nach  $a$  auf, so erhalten

wir für  $a = \sqrt{ck + \left(\frac{d}{2}\right)^2} - \frac{d}{2}$ . Lässt sich schon aus diesem

Ausdruck ein Schluss auf die minimale Grösse  $a$  ziehen, wenn  $d$  sehr gross wird, so werden diese Verhältnisse noch anschaulicher, wenn wir die Rechnung für die von uns als Beispiel gewählte 1 litrige Salzsäure durchführen. In diesem Falle beträgt die Concentration der zugesetzten Wasserstoff-

ausgeführten Rechnung ca.  $2 \cdot 10^{-10}$ , demnach wird  $a =$

$\sqrt{0,0000000002 + \left(\frac{0,78}{2}\right)^2} - \left(\frac{0,78}{2}\right)^2$  d. h. es erreicht eine im Vergleich zu seinem vorherigen Werthe 0,0000143 verschwindend kleine Grösse. Auch wenn wir die Salzsäure hundertmal verdünnter anwenden, bleibt der Werth von  $a$  noch sehr klein und erreicht erst bei 1000ltriger Säure den hundertsten Theil des vorherigen Werthes. Da  $a$  die Concentration der primären Harnsäure-Ionen bedeutet, geht aus diesen Betrachtungen, die auch für andere Säuren Gültigkeit haben, hervor, dass durch den Zusatz einer starken Säure zu einer wässerigen Lösung von Harnsäure der Dissociationsgrad der Letzteren vermindert oder, wie man allgemein zu sagen pflegt, die Dissociation der Harnsäure zurückgedrängt wird. Ferner haben wir gesehen, dass diese Zurückdrängung der Dissociation schon bei Gegenwart von 100ltriger ( $= \frac{1}{100}$  normaler) Salzsäure so vollständig ist, dass sie vom praktischen Standpunkt aus durch weiteren Zusatz von Säure nicht gesteigert werden kann. Schliesslich haben wir noch zu untersuchen, welchen Einfluss diese Rückdrängung der Dissociation auf die Löslichkeit der Harnsäure ausübt.

Durch die Vereinigung der primären Harnsäure-Ionen mit den Wasserstoff-Ionen entstehen nicht dissocierte Harnsäuremolekeln. Deren Concentration  $c$  kann aber, weil wir es mit einer gesättigten Lösung zu thun haben, nicht grösser werden und in Folge dessen müssen sich alle diejenigen Harnsäuremolekeln, welche durch die Rückdrängung der Dissociation gebildet werden, in der Form fester Harnsäure abscheiden. Der Zusatz einer starken Säure zu einer gesättigten Harnsäurelösung hat demnach nicht nur eine Rückdrängung der Dissociation, sondern auch eine Verminderung der Löslichkeit zur Folge. Da die Concentration der dissocierten Harnsäure 9,5% der gesammten in Lösung befindlichen Säure beträgt, geht die Löslichkeit derselben um diesen Betrag zurück. Das Ergebniss dieser Betrachtungen können wir demnach dahin zusammenfassen: Die Löslichkeit der Harnsäure wird

schon in 100litrigen Säuren den Minimalwerth von 7336 Litern, welcher einem Löslichkeitsverhältniss von 1:43620 oder einem Gehalt von 0,0229 g Harnsäure in 1 Liter Lösung entspricht. Wie die Löslichkeitsversuche mit diesen theoretischen Berechnungen übereinstimmen, soll in folgendem Abschnitt gezeigt werden.

## 2. Löslichkeitsversuche.

Die Löslichkeit der Harnsäure in den wässerigen Lösungen starker Säuren wurde in derselben Weise ermittelt, wie wir dies in der ersten Abhandlung bei der Löslichkeitsbestimmung in reinem Wasser beschrieben haben. Die Säurelösungen, welche durch Verdünnen einer titrirten, starken, reinen Säure mit reinem kohlenensäurefreien Wasser von der durchschnittlichen specifischen elektrischen Leitfähigkeit  $1,0 \times 10^{-6}$  hergestellt wurden, brachten wir mit einer gewogenen Menge überschüssiger reiner Harnsäure in sorgfältig verschlossenen Erlenmeyer'schen Kolben in den Rotationsapparat, filtrirten dann durch den Gooch'schen Tiegel und wogen schliesslich nach dem Trocknen die nichtgelöste Säure zurück. Alle Löslichkeitsbestimmungen wurden bei  $18^{\circ}$  ausgeführt. Bei sämtlichen Versuchen benutzten wir die von uns aus reinem primärem harnsaurem Kalium dargestellte Harnsäure.

1. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure in 1 litriger (normaler) Salzsäure (= 3,65% HCl).

Nr.		Lösungsver- hältniss auf das Gewicht eines gleichen Volums Wasser berechnet	In 1 Liter Lösung sind enthalten g Harnsäure	Zahl der Liter, in denen 1 Mol = 168,2 g Harnsäure gelöst ist
1	Nach 1 $\frac{1}{2}$ stündigem Rotiren waren gelöst in 713,6 ccm. normaler Salzsäure 0,0166 g Harnsäure . . . . .	1 : 42990	0,0233	7231
2	Nach 2 $\frac{1}{2}$ stündigem Rotiren waren gelöst in 703,2 ccm. normaler Salzsäure 0,0168 g Harnsäure . . . . .	1 : 41860	0,0239	7041
	Mittel . . .	1 : 42430	0,0236	7136

**2. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure in 2litriger (normaler) Schwefelsäure (= 4,9%  $H_2SO_4$ ).**

Nr.		Lösungsver- hältnisse auf das Gewicht eines gleichen Volums Wasser berechnet	in 1 Liter Lösung sind enthalten g Harnsäure	Zahl der Liter, in denen 1 Mol = 168,3 g Harnsäure gelöst ist
1	Nach einer Rotationszeit von 75 Minuten waren gelöst in 705,5 ccm. normaler Schwefelsäure 0,0161 g Harnsäure . .	1: 43820	0,0228	7370
2	Nach 2stündigem Rotiren waren gelöst in 698,0 ccm. normaler Schwefelsäure 0,0157 g Harnsäure . . . . .	1: 44460	0,0225	7478
	Mittel . . .	44140	0,0227	7424

Aus diesen beiden Versuchsreihen geht Folgendes hervor:

1. Wie bei den Löslichkeitsversuchen in reinem Wasser, wird auch hier der Sättigungspunkt bereits nach 1- bis 2stündiger Rotationsdauer erreicht.

2. Die auf Grund der elektrolytischen Dissociationstheorie angestellten theoretischen Betrachtungen haben nicht nur in qualitativer, sondern auch in quantitativer Beziehung eine Bestätigung erfahren. Die Löslichkeit der Harnsäure in der verdünnten Salzsäure, wie auch in der verdünnten Schwefelsäure ist geringer, wie im reinen Wasser. Die thatsächlich gefundene Löslichkeit 1:42430 und 1:44140 stimmt mit der theoretisch berechneten 1:43620 unter Berücksichtigung der bei solchen Versuchen unvermeidlichen Fehlerquellen sehr befriedigend überein. Die Anwendung der elektrolytischen Dissociationstheorie auf derartige Untersuchungen erweist sich demnach als sehr zweckmässig.

3. In normaler Salz- und Schwefelsäure vermag die Harnsäure keine positiven Ionen zu bilden, d. h. sie vermag nicht als Base zu functioniren. Wäre dies der Fall, so müsste die Löslichkeit der Harnsäure in diesen Säuren grösser wie in reinem Wasser sein.

die Löslichkeit der Harnsäure in Säurelösungen stärkerer Concentration ist. Dabei ist noch zu berücksichtigen, dass bei Anwendung grosser Concentrationen Aenderungen in der Löslichkeit eintreten können, da unsere theoretischen Betrachtungen und bisherigen Versuche nur Lösungen betrafen, bei denen das Wasser in der Hauptsache das Lösungsmittel war. Wenn aber die Säuren einen wesentlichen Theil des Lösungsmittels bilden (3,75 bzw. 6,24fach normale Salzsäure mit 13,69% bzw. 22,77% HCl und 3,2 bzw. 6,4fach normale Schwefelsäure mit 15,67% bzw. 31,34%  $H_2SO_4$ ), so muss sich, wie wir schon oben auseinandergesetzt haben, ihr specifischer Einfluss auf das Löslichkeitsverhältniss bemerkbar machen. Die Rotationszeiten bei diesen Versuchen schwankten zwischen 1 bis 6 Tagen, da wir gleichzeitig untersuchen wollten, ob und in welchem Maasse die bei rein wässerigen Aufschwemmungen beobachtete Zersetzung der Harnsäure bei Gegenwart dieser Säuren auftritt.

3. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure in 0,267 litriger = 3,75fach normaler Salzsäure (= 13,69% HCl).

Nr.		Lösungsverhältnisse auf das Gewicht eines gleichen Volums Wasser berechnet	In 1 Liter Lösung sind enthalten g Harnsäure	Zahl der Liter, in denen 1 Mol = 168,2 g Harnsäure gelöst ist
1	Nach 22stündigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 3,75fach normaler Salzsäure 0,0057 g Harnsäure . . . . .	1 : 35100	0,0285	5900
2	Nach 6tägigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 3,75fach normaler Salzsäure 0,0048 g Harnsäure . . . . .	1 : 41670	0,0240	7000
	Mittel . . .	1 : 38390	0,0263	6450

4. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure in 0,16 litriger = 6,24fach normaler Salzsäure (= 22,77% HCl).

Nr.		Lösungsver- hältnis auf das Gewicht eines gleichen Volums Wasser berechnet	In 1 Liter Lösung sind enthalten g Harnsäure	Zahl der Lite- ren in denen 1 Mol = 168,3 Harnsäure gelöst ist
1	Nach 24stündigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 6,24fach normaler Salzsäure 0,0080 g Harnsäure . . . . .	1 : 25000	0,0400	4200
2	Nach 40stündigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 6,24fach normaler Salzsäure 0,0070 g Harnsäure . . . . .	1 : 28570	0,0350	4800
	Mittel . . .	1 : 26790	0,0375	4500

5. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure in  
0,625ltriger = 3,2fach normaler Schwefelsäure (= 15,67%  
 $H_2SO_4$ ).

Nr.		Lösungsver- hältnis auf das Gewicht eines gleichen Volums Wasser berechnet	In 1 Liter Lösung sind enthalten g Harnsäure	Zahl der Liter, in denen 1 Mol = 168,3 g Harnsäure gelöst ist
1	Nach 26 stündigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 3,2fach normaler Schwefel- säure 0,0029 g Harnsäure . . . . .	1 : 68960	0,0145	11580
2	Nach 6tägigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 3,2fach normaler Schwefel- säure 0,0053 g Harnsäure . . . . .	1 : 37740	0,0265	6340
	Mittel . . .	1 : 53350	0,0205	8960

6. Versuchsreihe. Löslichkeit der Harnsäure in  
0,313ltriger = 6,4fach normaler Schwefelsäure (= 31,34%  
 $H_2SO_4$ ).

Nr.		Lösungsver- hältnisse auf d. Gewicht ein- gleiches Volum Wasser	In 1 Liter Lösung sind enthalten g Harnsäure	Zahl der Lit- in denen 1 Mol = 108,5 g Harnsäure gelöst ist
		berechnet		
1	Nach 29 stündigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 6,4fach normaler Schwefel- säure 0,0035 g Harnsäure . . . . .	1 : 57150	0,0175	9600
2	Nach 47 stündigem Rotiren waren gelöst in 200 ccm. 6,4fach normaler Schwefel- säure 0,0038 g Harnsäure . . . . .	1 : 52620	0,0190	8840
	Mittel . . .	1 : 54890	0,0183	9220

Das Resultat dieser vier Versuchsreihen ist folgendes:

1. Die Löslichkeit der Harnsäure in der ca. 4- und 6 fach normalen Salzsäure kommt derjenigen in reinem Wasser ziemlich nahe. Die Abweichungen liegen aber innerhalb der Versuchsfehler, wenn man berücksichtigt, dass das Volum 200 ccm. für derartige Bestimmungen verhältnissmässig klein ist.

2. Die Löslichkeit der Harnsäure in der ca. 3- und 6 fach normalen Schwefelsäure ist durchgängig erheblich kleiner, als in reinem Wasser. Der Umstand, dass die Löslichkeit noch geringer ist, als diejenige bei vollkommener Zurückdrängung der elektrolytischen Dissociation der Harnsäure (1 : 53350 und 1 : 54890 gegen 1 : 43620), ist jedenfalls auf den specifischen Einfluss der Schwefelsäure als Lösungsmittel zurückzuführen, welche hier ca. den 6. bzw. 3. Theil des Lösungsmittels ausmacht.

3. Die Zersetzung der Harnsäure, welche bei längerer Berührung derselben mit Wasser eintritt, geht bei Gegenwart starker Säuren nicht oder nur in äusserst geringem Maasse vor sich. Nach sechstägigem Rotiren mit ca. 4fach normaler Salzsäure war noch weniger Harnsäure gelöst, wie in reinem Wasser und nach der ebenso lange dauernden Rotation mit

ca. 3fach normaler Schwefelsäure lag die Abweichung innerhalb der Versuchsfehler.<sup>1)</sup>

4. Auch in ca. 6fach normaler Salzsäure und Schwefelsäure vermag die Harnsäure keine positiven Ionen zu bilden, d. h. als Base zu functioniren. So erweisen sich die Analogieschlüsse, welche man auf Grund der dem Xanthin, Guanin, Theobromin etc. ähnlichen Constitution und deren Eigenschaft, sowohl als schwache Säure, als auch als schwache Base aufzutreten, ziehen könnte, als nicht zutreffend.

### 3. Schlussfolgerungen.

Die Ergebnisse vorstehender Untersuchungen können wir in folgenden Sätzen zusammenfassen:

1. *Die in der Litteratur vielfach verbreitete Ansicht, dass die Harnsäure in wässerigen Lösungen starker Säuren erheblich leichter löslich sei, als in Wasser, beruht auf Irrthum.*

2. *Die Löslichkeit der Harnsäure in normaler Salzsäure und Schwefelsäure erwies sich im Gegentheil geringer wie in reinem Wasser.*

3. *Diese in verdünnten Säuren beobachtete Löslichkeitsverminderung steht im vollen Einklang mit der Theorie der elektrolitischen Dissociation. Sie liess sich nach derselben nicht nur voraussehen, sondern sogar zahlenmässig feststellen. Nach dieser Theorie veranlasst ein Zusatz starker Säuren zu einer wässerigen Harnsäurelösung wegen der damit verbundenen Zunahme der Concentration der Wasserstoff-Ionen eine Zurückdrängung der Dissociation der Harnsäure und damit eine Verminderung der Löslichkeit. Das theoretisch berechnete Löslichkeitsverhältniss 1 : 43620 stimmt mit thatsächlich beobachteten Verhältnissen 1 : 42430 (bei normaler Salzsäure) und 1 : 44140 (bei normaler Schwefelsäure) unter Berücksichtigung der bei solchen Versuchen unvermeidlichen Fehlerquellen sehr befriedigend überein.*

---

<sup>1)</sup> Berthelot und André (Bullet. de la société de chimie (2) 47, 840) haben gefunden, dass Harnsäure nach 2 Stunden langem Verreiben mit 10 %iger Salzsäure beim Kochen mit Magnesia 1 % ihres Stickstoffs als Ammoniak abgibt.



säure findet keine Löslichkeitszunahme der Harnsäure gegenüber der in reinem Wasser statt; bei der Schwefelsäure geht die Löslichkeit sogar auf 1 : 54890 zurück. Diese Löslichkeitsverminderung ist jedenfalls auf den specifischen Einfluss der Schwefelsäure als Lösungsmittel zurückzuführen.

5. Auch in ca. 6fach normaler Salzsäure und Schwefelsäure vermag die Harnsäure keine positiven Ionen zu bilden, d. h. als Base zu functioniren. Wäre dies der Fall, so müsste die Löslichkeit derselben in diesen Säuren grösser sein, wie in reinem Wasser.

6. Die Zersetzung der Harnsäure, welche bei längerer Berührung derselben mit Wasser eintritt, geht bei Gegenwart starker Säuren nicht oder nur in äusserst geringem Maasse vor sich.

7. Die Bestimmung der Harnsäure in ihren Salzen durch Abscheidung mittelst überschüssiger Salzsäure, oder besser Schwefelsäure, führt zu genauen Resultaten, wenn die Uebersättigungserscheinungen durch anhaltendes Schütteln vermieden werden und für den in der Lösung zurückbleibenden Theil eine Correction von 2 mg für 100 ccm. Flüssigkeit (bei 18°) angebracht wird.

---

# Ueber das proteolytische und ein eiweisscoagulirendes Enzym in keimender Gerste (Malz).

Von

cand. mag. Fr. Wels

Assistent am Carlsberg-Laboratorium, Kopenhagen.

---

(Der Redaction zugegangen am 20. September 1900.)

---

## I. Das proteolytische Enzym (Peptase).

Im Anschluss an die von Windisch und Schellhorn<sup>1)</sup>, Fernbach und Hubert<sup>2)</sup>, sowie Petit und Labourasse<sup>3)</sup> in den letzten Monaten veröffentlichten Mittheilungen über den Nachweis des proteolytischen Enzyms in keimender Gerste und Malz beabsichtige ich einige der wichtigsten Resultate zu veröffentlichen, welche ich durch meine Beschäftigung mit diesem Gegenstande im Laufe der letzten zwei Jahre erlangt habe. Dass dieses Enzym existiren musste, war mir a priori so einleuchtend, dass ich mich zu einer Veröffentlichung meines Nachweises desselben nicht veranlasst gefunden habe, bevor ich eine vollständige Bearbeitung meiner überaus zahlreichen Versuche über dessen Eigenschaften und Wirkungsweise vorlegen konnte. Ohne im geringsten jedoch die Priorität der Herren Windisch und Schellhorn in dieser Frage angreifen zu wollen, sehe ich mich doch schon jetzt, ehe meine Arbeit völlig abgeschlossen ist, veranlasst, eine vorläufige Mittheilung von derselben zu machen, welche ihre Berechtigung darin finden wird, dass ich durch andere Methoden, als die von den oben genannten Herren angewandten, die Existenz des Enzyms nachgewiesen, sowie durch quantitative Bestimmungen dessen Wirkungen und Abhängig-

---

<sup>1)</sup> Wochenschrift für Brauerei 17. Jahrgang d. 15/6, 29/6, 13/7, 20/7 1900.

<sup>2)</sup> Comptes rendus de l'Académie des sciences 25/6 1900.

<sup>3)</sup> Comptes rendus de l'Académie des sciences 30/7, 6/8 1900.

der Meinung, dieses Thema von theilweise anderen Gesichtspunkten aus, als die genannten Herren, behandelt zu haben, namentlich mit Rücksicht auf die Fragen, welche Bedeutung für die Praxis (z. B. die Wirkung des Enzyms auf den Brauprocess) erlangen können.

Der kürzlich verstorbene Professor Kjeldahl hat in Versuchen, die nicht veröffentlicht sind, die Existenz des Enzyms nachgewiesen, indem er Malzauszüge auf Gluten («Kleber») in schwachen salzsauren oder milchsauren Auflösungen einwirken liess und mit Hülfe von Kupfersulfat nach Neutralisation durch Natron-Seignettesalz die Menge des Eiweissstoffes, welcher von und nach den Versuchen ausfiel, bestimmte.

Da Prof. Kjeldahl aus anderen Gründen diese Versuche unterbrechen musste, habe ich dieselben auf seine Aufforderung wieder aufgenommen, bin jedoch bald zu einer anderen Arbeitsmethode übergegangen, welche sich für die Verfolgung des proteolytischen Processes bequemer zeigte. Kjeldahl's Versuche sind nämlich angestellt, bevor er seine Methode für die Bestimmung des Stickstoffes fand. Diese ist es, welche ich auf die unten angeführte Weise zur Anwendung gebracht habe.

Meine Versuche haben sich bisher in zwei Hauptgruppen getheilt: 1. Versuche mit Grünmalz, 2. Versuche mit Darrmalz, sowie ich gelegentlich auch die Enzymwirkungen im Auszug von Gerstenkörnern in späteren Keimungsstadien als dem Grünmalz untersucht habe.

### 1. Versuche mit Grünmalz.

Zu diesen sind die fertig gekeimten Gerstenkörner verwendet worden, unmittelbar bevor dieselben zum Trocknen auf die Darre gebracht werden. Die Körner wurden in einer Fleischhackemaschine zu einem dicken Brei zerquetscht und darauf mit Wasser angerührt (gewöhnlich 3 Theile Malz auf 4 Theile Wasser). Nach dem Verlaufe von  $\frac{1}{2}$ —1 Stunde, während welcher Zeit die Masse einige Male umgerührt wurde, wurde sie auf ein Faltenfilter gegossen und das Filtrat auf

dasselbe zurückgegossen, bis es klar hindurch lief (in der Regel nach  $\frac{1}{4}$  Stunde). Demnächst wurde das Ganze in einem Eisschranke bei einer Temperatur von circa  $5^{\circ}$  C. bis zum nächsten Tage gehalten, worauf das Filtrat zur Anwendung kam. Sollte derselbe Auszug in mehreren, aufeinander folgenden Tagen benutzt werden, so wurde er in einen Eiseimer mit einer Temperatur von  $0^{\circ}$  C. gebracht, wo derselbe sich ungeschwächt wenigstens 8 Tage lang halten konnte. Dahingegen wurde das Enzym nach und nach bei  $5^{\circ}$  C. stark geschwächt, wahrscheinlicher Weise in Folge einer bald eintretenden sauren Gährung des Auszugs. Zur Bestimmung der proteolytischen Wirkungen des Auszugs wurde an Stelle von »Kleber« ein aus Weizenmehl durch Behandlung mit 55% Alkohol ausgezogener Eiweissstoff (Weizenglutin) angewendet, der später durch wiederholtes Ausfrieren gereinigt und schliesslich mit absolutem Alkohol niedergeschlagen wurde, danach pulverisirt, mit Aether und Alkohol nachgewaschen, im Vacuum zu einem sehr feinen Pulver getrocknet, das in Wasser unlöslich, aber in sehr schwachen anorganischen Säuren, besser jedoch noch in Milch- oder Essigsäure, löslich ist. Bei den meisten meiner Versuche (Grundversuche) habe ich eine 2%ige Auflösung von Glutin in 0,4%iger Milchsäure angewandt, welche ich mit einem gleich grossen Volumen Malzauszug vermischte, wodurch ich demnach 1% Glutin und 0,2% Milchsäure ausser den im Malzauszug enthaltenen Eiweissstoffen und Säuren zu meiner Arbeit erhielt. 10 ccm. Glutinauflösung + 10 ccm. Malzauszug werden in einem 100 ccm.-Messkolben gemischt und bei  $47^{\circ}$ — $48^{\circ}$  (was sich bei besonders angestellten Versuchen als Temperaturoptimum erwies) im Wasserbade (Maischbecher) 2 Stunden lang gehalten. Nach schneller Abkühlung wurden jedem Kolben 10 ccm. einer 5%igen Gerbsäurelösung zugesetzt, mit Wasser zu 100 ccm. verdünnt und nach einer Weile filtrirt. Das Filtrat war völlig wasserklar und von diesem wurden 50 ccm. zu jeder Bestimmung verwendet. Nach Eindampfen unter Zusatz von einigen Tropfen concentrirter Schwefelsäure in langhalsigen Kochkolben (Stickstoffkolben) ungefähr bis zur Trockne wurde die Stickstoffbestimmung auf gewöhnliche Weise

immer im Filtrat vom Gerbsäureniederschlage der Mischungen von Glutin und Malzauszügen, bez. von Glutin oder Malzauszügen allein, sowohl vor wie nach der Einwirkung ausgeführt wurden (das ganze unbeeinflusste Glutin wurde übrigens von Gerbsäure niedergeschlagen), wurde demnach die im Laufe der Versuche bemerkbare Zunahme des Stickstoffes in dem Filtrat von dem Gerbsäureniederschlage als Maass für die Wirkungen des proteolytischen Enzyms (Peptase) benutzt.

Ich gehe hier nicht näher auf die qualitative Seite der Sache ein, weil meine Versuche in dieser Richtung noch nicht abgeschlossen sind, sondern mache nur darauf aufmerksam, dass unter der Einwirkung des Enzyms eine bedeutende Menge von Stoffen gebildet werden, die nicht durch Gerbsäure gefällt werden, was sicherlich eine ziemlich tief gehende Zersetzung der Eiweissstoffe bezeichnet. Vergleichende Versuche, welche ich über die Einwirkung des Pepsins sowohl auf Glutin als auf Casein in milchsaurer und salzsaurer Lösung von verschiedener Stärke anstellte, gaben nämlich das Resultat, dass durch Malzenzym mehr N, der nicht von Gerbsäure ausgefällt wird, als durch Pepsin gebildet wurde. Das schliesst natürlicher Weise nicht aus, dass das Pepsin auf früheren Stadien der Zersetzung bei Weitem kräftiger gewirkt und z. B. eine grössere Menge von Albumosen und verschiedenen Peptonen gebildet haben kann. Man muss sich überhaupt, wenn es sich um Zersetzungen der Eiweissstoffe durch Enzyme handelt, genau einprägen, welche Art von Eiweissstoffen gemeint ist und welche Fällungsmittel angewendet werden. Denn die Bildung der Produkte, welche mit verschiedenen Fällungsmitteln nachgewiesen wird, kann möglicher Weise verschiedene Abhängigkeit von äusseren Factoren aufweisen. Ein bestimmtes Fällungsmittel enthüllt nur eine bestimmte Phase der Enzymwirkung. Beispielsweise wird angeführt, dass Kjeldahl durch Ausfällung mit  $\text{CuSO}_4$  das Temperaturoptimum zwischen  $50,5^\circ$  und  $55^\circ$  liegend fand, während ich bei Fällung mit Gerbsäure dasselbe zwischen  $47^\circ$  und  $48^\circ$  fand. Vielleicht wird der grösste Theil der

Produkte, die sich nicht mit  $\text{CaSO}_4$  ausfallen lassen, bei  $50,5$ — $55^\circ$  gebildet werden, während bei  $47$ — $48^\circ$  die meisten der Stoffe entstehen, welche nicht durch Gerbsäure ausgefällt werden.

Hier werde ich denn einige der wichtigsten meiner zahlreichen Versuche anführen.

**Der Einfluss der Temperatur.** Der Malzauszug (Mu) wurde aus 1 Theil Malz und 2 Theilen Wasser bereitet, war also etwas schwächer als in späteren Versuchen. Von Glutin (Gl) wurde eine 2%ige Auflösung in einer 0,4%igen Milchsäure angewandt. 20 ccm. Mu + 10 ccm. Gl unter Zusatz von Thymol stand 2 Stunden lang bei verschiedener Temperatur. Spätere Versuche bewiesen, dass Thymol die Enzymwirkung abschwächt, daher fand ich verhältnissmässig niedrige Zahlen. Folgende 4 Versuchsreihen wurden mit demselben Malzauszug, jedoch zu verschiedenen Zeiten, angestellt. Derselbe stand in der Zwischenzeit im Eiseimer bei  $0^\circ$ , schwächte sich jedoch allmählich ab, wahrscheinlich in Folge des zugesetzten Thymols. Von den beiden zusammengehörigen Kolonnen wird die rechte angegeben, wie viele Milligramm N sich nach den Versuchen der Fällung durch Gerbsäure entzogen haben, der Abkürzung wegen «peptonisirter N» genannt.

I. Reihe		II. Reihe		III. Reihe		IV. Reihe	
27. Januar 1899		27. Januar 1899		28. Januar 1899		30. Januar 1899	
Temp.	Peptonis. N	Temp.	Peptonis. N	Temp.	Peptonis. N	Temp.	Peptonis. N
$5^\circ$	0,00 mg	—	—	—	—	—	—
$15^\circ$	0,42 »	—	—	—	—	—	—
$25^\circ$	1,42 »	—	—	—	—	—	—
$35^\circ$	3,80 »	$47^\circ$	5,42 mg	$46^\circ$	4,50 mg	—	—
$45^\circ$	5,34 »	$49^\circ$	5,14 »	$48^\circ$	4,58 »	—	—
$50^\circ$	5,38 »	$51^\circ$	4,88 »	$52^\circ$	4,14 »	$50^\circ$	3,92 mg
$55^\circ$	3,54 »	$53^\circ$	4,74 »	$54^\circ$	3,26 »	—	—
$60^\circ$	2,04 »	—	—	—	—	—	—
$65^\circ$	—	—	—	—	—	$65^\circ$	1,40 mg
$70^\circ$	—	—	—	—	—	$70^\circ$	0,08 »

6\*

dauerte, zeigte sich jedoch ein Steigen des peptonisirten N zwischen 0—5°.

0° :	0,01 mg N
5° :	0,30 mg N
10° :	1,47 mg N
20° :	2,32 mg N.

Zusammen genommen weisen die genannten Versuche ein allmähliches Steigen mit der Temperatur von 0° bis 47°—48° auf und danach ein jähes Fallen bis 70°, bei welcher Temperatur eine jede Wirkung aufgehört hat.

Der Einfluss verschiedener Antiseptica. Zum Unterschied von mehreren anderen Enzymen ist das hier besprochene (welches ich Peptase zu nennen pflege) sehr empfindlich gegen Antiseptica, wie folgende Versuche beweisen werden. Nach Verlauf von 2 Stunden waren bei einer Temperatur von 47° in 10 ccm. Gl. + 10 ccm. Malzauszug gebildet folgende Mengen peptonisirtes N:

Ohne Antiseptica . . .	9,96 mg	Mit 0,00 % Formol . .	10,16 mg
Mit Thymol gesättigt . .	6,72 „	„ 0,125 „ „ . .	6,28 „
„ Chloroform gesättigt	5,82 „	„ 0,50 „ „ . .	4,96 „
„ 1% Formol . . . .	3,20 „	„ 0,75 „ „ . .	4,16 „
„ 1% Benzoesäure . .	2,16 „	„ 1,00 „ „ . .	3,82 „
„ 1% Salicylsäure . .	0,92 „	„ 1,25 „ „ . .	3,12 „
		„ 1,50 „ „ . .	2,54 „

Die angeführten Stoffe bewirken demnach eine sehr merkbare Schwächung der Enzymwirkungen selbst in sehr schwachen Concentrationen. Wenn Benzoe- und Salicylsäure anscheinend kräftigst in solcher Hinsicht wirken, ist es sicherlich dem Umstande zuzuschreiben, dass diese theilweise das Glutin und damit ebenfalls das Enzym ausfällen. Dass Antiseptica allmählich das Enzym selbst destruiren und nicht an und für sich dessen Wirkung hindern, können vielleicht folgende Versuche ergeben. Die Destruction ist hier als ein langsam fortschreitender und nicht als ein augenblicklicher Process anzusehen.

	Ohne Formol	Mit 1% Formol
Nach $\frac{1}{2}$ Stunde bei 47° wurde peptonisirt . . . .	3,82 mg N	1,12 mg N
Nach 1 Stunde bei 47° wurde peptonisirt . . . .	—	2,14 mg N
Nach 2 Stunden bei 47° wurde peptonisirt . . . .	10,16 mg N	2,46 mg N

Aus diesen Versuchen sieht man, wie vorsichtig man mit dem Zusetzen von Antiseptics sein muss. Dieselben sind auch bei späteren Versuchen nur ausnahmsweise benutzt, während man den Auszug durch Kaltstellen aufbewahrt. Lange dauernde Versuche werden ebenfalls unsicher, weil sich allmählich Fäulnisbakterien entwickeln. Deshalb haben meine folgenden Versuche meistentheils auch nicht über zwei Stunden gedauert.

**Einfluss der Säuren.** Im Gegensatz zu den Herren Windisch und Schellhorn habe ich stets die besten Resultate bei Anwendung von saurer Reaction erreicht. Die Versuche, welche ich bisher mit neutraler und alkalischer Reaction (zur Alkalisierung wurde  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge gebraucht) angestellt habe, sind alle negativ ausgefallen. Trotz des günstigen Einflusses, den die Säuren haben, sind doch nur äusserst schwache Concentrationen gestattet; namentlich gilt dieses von den untersuchten unorganischen Säuren. Unten angegebene Versuche sind wie gewöhnlich mit 10 ccm. Glutin in der betreffenden Säure aufgelöst und 10 ccm. Malzauszug, welcher seine ursprüngliche (saure) Reaction bewahrt hat, angestellt. Letztere kann etwas in den verschiedenen Auszügen variiren, weil sie 1,25—2 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normalnatronlauge zur Neutralisation von 10 ccm. verlangt.

Ein Zusatz von freier Säure erhöht doch immer die Selbstpeptonisirung des Malzauszuges in verhältnissmässig hohem Grade. Nach Ad. Ott (Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, XX, 1897, S. 633—636) wird im normalen Malz und Würze keine freie Säure gefunden. Die saure Reaction rührt hauptsächlich von sauren Phosphaten her. Erst durch eintretende Gährung bilden sich freie organische Säuren (Milch-, Essig- und Bernsteinsäure). Es wird nämlich immer im Malzauszug ein Theil Eiweissstoff, der von dem Enzym be-



3 Theilen Malz zu 4 Theilen Wasser wird in 10 ccm. 16 bis 19 mg Totalstickstoff gefunden, wovon ca. die Hälfte (durchschnittlich 52—53%, welche Zahlen nur sehr wenig variiren, zwischen 50,3 und 55,5%) nicht von Gerbsäure niedergeschlagen wird. In Versuchen mit Malzauszügen allein mit 0,2% iger Milchsäure wird der peptonisirte N in der Regel um 2,0 bis 2,5 mg im Laufe von 2 Stunden bei 47° C. erhöht. Von dem Einfluss der Milchsäure auf die Selbstpeptonisirung des Malzauszuges gaben folgende Versuche einen Begriff:

10 ccm. Mu. 2 Stunden bei 47° C.

Milchsäure	Peptonisirter N
0,0 ‰	0,72 mg
0,25 ‰	0,90 „
1,0 ‰	1,90 „
5,0 ‰	2,80 „
10,0 ‰	1,66 „
20,0 ‰	0,70 „

Wir erhalten hier in der Hauptsache dieselben Curven wie in den Versuchen durch Mischungen von Glutin und Malzauszug.

Milchsäure	Peptonisirter N		Essigsäure	Peptonisirter N	
	I.	II.		I.	II.
0,25 ‰ = $\frac{1}{400}$ Normals.	1,98 mg	— mg	0,15 ‰ = $\frac{1}{660}$ Normals.	1,98 mg	— mg
0,50 ‰ = $\frac{1}{200}$ „	5,04 „	— „	0,2 ‰ = $\frac{1}{500}$ „	3,02 „	— „
1,0 ‰ = $\frac{1}{100}$ „	8,40 „	6,62 „	0,3 ‰ = $\frac{1}{300}$ „	3,62 „	— „
1,5 ‰ = $\frac{1}{60}$ „	— „	6,74 „	0,45 ‰ = $\frac{1}{220}$ „	4,80 „	— „
2,0 ‰ = $\frac{1}{50}$ „	8,88 „	7,12 „	0,6 ‰ = $\frac{1}{160}$ „	6,38 „	— „
2,5 ‰ = $\frac{1}{40}$ „	— „	6,46 „	0,9 ‰ = $\frac{1}{110}$ „	7,76 „	— „
3,0 ‰ = $\frac{1}{30}$ „	— „	6,40 „	1,5 ‰ = $\frac{1}{60}$ „	8,44 „	7,04 „
3,5 ‰ = $\frac{1}{28,5}$ „	— „	5,84 „	3,0 ‰ = $\frac{1}{30}$ „	9,80 „	7,68 „
4,0 ‰ = $\frac{1}{25}$ „	7,04 „	5,64 „	4,5 ‰ = $\frac{1}{20}$ „	— „	7,52 „
6,0 ‰ = $\frac{1}{15}$ „	4,20 „	— „	6,0 ‰ = $\frac{1}{15}$ „	9,18 „	7,20 „
8,0 ‰ = $\frac{1}{11}$ „	3,86 „	— „	9,0 ‰ = $\frac{1}{10}$ „	— „	6,34 „
10,0 ‰ = $\frac{1}{10}$ „	2,56 „	— „	12,0 ‰ = $\frac{1}{8}$ „	— „	5,20 „
15,0 ‰ = $\frac{1}{6}$ „	1,52 „	— „	18,0 ‰ = $\frac{1}{5}$ „	— „	3,62 „
20,0 ‰ = $\frac{1}{5}$ „	1,12 „	— „	30,0 ‰ = $\frac{1}{3}$ „	— „	1,98 „

Salzsäure	Peptonisirter N	Schwefelsäure	Peptonisirter N
0,018 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>5000</sub> Normals.	0,92 mg	0,024 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>5000</sub> Normals.	0,94 mg
0,045 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>200</sub> »	1,08 »	0,060 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>1000</sub> »	1,38 »
0,090 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>1000</sub> »	1,84 »	0,120 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>400</sub> »	2,10 »
0,180 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>500</sub> »	5,24 »	0,240 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>200</sub> »	4,42 »
0,360 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>100</sub> »	8,66 »	0,330 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>150</sub> »	5,48 »
0,720 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>50</sub> »	2,96 »	0,490 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>100</sub> »	7,14 »
1,800 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>20</sub> »	0,52 »	0,650 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>75</sub> »	5,10 »
		0,980 <sup>0</sup> / <sub>100</sub> = <sup>1</sup> / <sub>50</sub> »	0,06 »

Die angeführten Versuche zeigen, dass sowohl die organischen wie die unorganischen Säuren in einer gewissen Concentration einen stark beschleunigenden Einfluss auf die Wirkungen des Enzyms haben, aber dass letzteres ausserordentlich empfindlich geringen Veränderungen im Säuregrad gegenüber ist, namentlich gegenüber den unorganischen Säuren. Man kann nicht hinauf bis zu 1<sup>0</sup>/<sub>100</sub> Schwefelsäure gelangen, bevor das Enzym plötzlich zersetzt wird, während <sup>1</sup>/<sub>2</sub><sup>0</sup>/<sub>100</sub> einen sehr günstigen Einfluss auf dasselbe hat. Milchsäure und Essigsäure haben dahingegen noch bei 20—30<sup>0</sup>/<sub>100</sub> einen sichtlich günstigen Einfluss, und das Optimum für diese Säuren liegt bei 2—4<sup>0</sup>/<sub>100</sub>.

Die Natur und Concentration des Eiweissstoffes. Wahrscheinlicher Weise verhält das Enzym sich verschiedenen Eiweissstoffen gegenüber verschieden. Vielleicht wird eben Fibrin, das von einigen Forschern, die zu negativen Resultaten gelangten, benutzt wurde, nicht beeinflusst. Es liegt nahe, anzunehmen, dass das Enzym besonders wirksam gegenüber den Eiweissstoffen der Gerste ist (Gerstenglutin), welche Einwirkung zuvörderst zu untersuchen insofern am natürlichsten sein würde. In Folge der grossen Schwierigkeit, welche die Herstellung einer so grossen Menge Gerstenglutin, wie ich zu meinen zahlreichen Versuchen nöthig hatte, verursacht, habe ich, wie schon erwähnt, an Stelle dessen Weizenglutin gebraucht, welches viel leichter herzustellen ist. Dass das Enzym

aus den untenangerührten Maischversuchen hervorgehen. — Was thierische Eiweissstoffe betrifft, habe ich nur die Wirkung auf Casein untersucht, sowohl in salzsaurer als auch in milchsaurer Lösung. In beiden Fällen wurde das Casein stark beeinflusst. In dem Versuch mit 1‰ Casein und 0,36‰ Salzsäure wurden 7,10 mg N peptonisirt, in einem anderen mit 2‰ Milchsäure 9,16 mg N, wahrscheinlicher Weise ist ausserdem ein grösserer Theil des Caseins zu Produkten (Albumosen, Propeptonen u. a. m.) umgebildet, welche wohl von Gerbsäure, aber nicht von einigen anderen Eiweissfällungsmitteln niedergeschlagen werden.

Es muss auch nicht vergessen werden, die Frage zu erörtern, wie weit das Peptonisiren überhaupt geführt werden kann, d. h. wie gross der Theil eines Eiweissstoffes ist, der umgebildet werden kann, ob vielleicht die ganze Menge nach dem Verlauf einer gewissen Zeit umgebildet ist. Will man untersuchen, in welcher Concentration ein bestimmter Eiweissstoff am besten umgebildet wird, muss man zugleich zwischen der absoluten Menge des peptonisirten N und der Grösse der Procentmenge des Totalstickstoffes unterscheiden. Es ist selbstverständlich, dass die Versuchszeit hier ein wichtiger Factor ist. Ich habe hierüber einige Versuche mit 2‰ Milchsäure angestellt, die ich unten ohne weitere Discussion anführe.

I. Versuchszeit 2 Stunden			II. Versuchszeit 5 Stunden		
Concentration des Glutins	Peptonisirter N	‰ des Total-N	Concentration des Glutins	Peptonisirter N	‰ des Total-N
0,25 ‰	1,88 mg	25,00 ‰	0,25 ‰	3,42 mg	45,60 ‰
0,5 ‰	3,52 „	23,47 ‰	0,5 ‰	6,56 „	43,73 ‰
1,0 ‰	6,54 „	21,80 ‰	1,0 ‰	10,92 „	36,40 ‰
2,0 ‰	9,84 „	16,40 ‰	2,0 ‰	15,12 „	25,20 ‰
3,0 ‰	12,61 „	14,01 ‰	3,0 ‰	18,34 „	20,38 ‰
4,0 ‰	11,51 „	9,59 ‰	4,0 ‰	19,28 „	16,07 ‰
5,0 ‰	12,32 „	8,21 ‰	5,0 ‰	19,92 „	12,28 ‰

Es scheint, dass die absolute Menge peptonisirter N, sobald man über 3‰ hinaus gelangt, nicht länger merklich mit der Concentration von Glutin vermehrt wird, selbst wenn

nächsten Umbildungsprodukten des Glutins (Albumosen u. s. w.) verhält, klären diese Versuche nicht auf.

**Das Keimungsstadium.** Ausser bei dem fertigen (9 Tage alten) Grünmalz habe ich auch die Enzymwirkung bei Gerste in einem späteren Keimungsstadium untersucht. Fertiges Grünmalz wurde 7 Tage hindurch an einem dunkeln Orte in einer Trommel angebracht, welche häufig herumgedreht und befeuchtet wurde. Aus den Körnern mit ihren langen Wurzeln und 7,8 cm. langen etiolirten Sprösslingen wurde durch Zerquetschen und Pressen ein wässriger Auszug mit ungefähr derselben Menge Totalstickstoff (19,42 mg in 10 ccm.) wie aus dem gewöhnlichen Malzauszug zubereitet. Von den 19,42 mg N wurden 11,76 mg oder 60,5% nicht durch Gerbsäure gefällt. (Vergl. S. 85.) Unter dem fortgesetzten Keimungsprocess sind also ferner circa 8% von dem Totalstickstoff peptonisirt worden. Wurde diesem Auszug 0,2% Milchsäure zugesetzt, so wurden in 2 Stunden bei 44°, ferner 2,30 mg N peptonisirt und liess ich das Malzenzym ein gleiches Volumen (10 ccm.) einer 2% igen Glutininlösung mit 0,4% Milchsäure beeinflussen, wurden 6,52 mg N des Glutins peptonisirt, also nur etwas weniger als in den Versuchen mit Grünmalzauszügen. Das eigentliche Selbstpeptonisierungsvermögen, wie das Vermögen, Weizenglutin umzubilden, hält sich demnach in späteren Keimungsstadien (bei 16 Tage alten Gerstenkeimpflanzen) beinahe ungeschwächt.

## 2. Versuche mit Darrmalz.

Es ist von besonderem Interesse für die Praxis, zu erfahren, ob das Enzym die verhältnissmässig hohe Temperatur (auf Alt Carlsberg Malzerei bis gegen 90°), wie man sie beim Trocknen des Malzes gewöhnlich gebraucht, ertragen kann.

Als Fortsetzung der vorangegangenen Versuche untersuchte ich darauf zunächst 1. ob der Darrmalzauszug auch auf Glutin wirke, und danach 2. ob eine Zersetzung der eigentlichen Malzeiweissstoffe unter dem Brauprocess, dem Maischen, vor sich geht.

Das angewandte Malz wurde auf einer Mühle ungefähr zu feinem Mehl gemahlen, in welchem die Spreustückchen gleichmässig sich vertheilen liessen. Die Masse wurde nun mit verschiedenen Mengen Wassers, bezw. 4 und 2 Theilen auf 1 Theil Malz digerirt. Im ersten Falle setzte ich 0,2% ige Milchsäure dem Wasser zu und liess den Auszug auf eine Glutininlösung in derselben Concentration von Milchsäure wirken; wo die rein wässerigen Auszüge angewandt wurden, wirkten sie dahingegen auf eine Glutininlösung in 0,4% iger Milchsäure und zur Untersuchung der Selbstpeptonisirung der Auszüge wurden sie mit einem gleichen Volumen Wassers mit oder ohne 0,2% ige Milchsäure verdünnt, so dass der schliessliche Gehalt an Milchsäure 0,2% oder 0% war. Ferner wurden vergleichende Versuche mit dem milchsauren Auszug angestellt, wobei derselbe in dem einen Fall in einem Wasserbade bei 100° erwärmt und bei dieser Temperatur 10 Minuten lang erhalten wurde, um das Enzym zu zerstören. Dabei wurden wie gewöhnlich 10 ccm. Malzauszug und 10 ccm. Glutin in 2% iger Auflösung verwendet.

Die Resultate der Versuche waren folgende:

	Total-N		Peptonisirter N			
	Nach zweistündiger Digestion bei 5°		Nach weiteren zwei Stunden bei 47°			
			Ohne Glutin	Differenz	Mit Glutin	Differenz
Wässeriger Auszug	10,72 mg	5,90 mg	5,94 mg	0,04 mg	9,00 mg	3,10 mg
Milchsaurer „	11,20 >	6,82 >	7,72 >	0,90 >	11,62 >	4,80 >
	Nach einstündiger Digestion bei 18°					
Milchsaurer Auszug						
a. Nicht gekocht	10,29 mg	5,74 mg	6,54 >	0,80 >	9,90 >	4,16 >
b. Gekocht	10,16 >	5,64 >	5,70 >	0,06 >	5,62 >	0,08 >
Wässeriger Auszug von 1 Theil Malz und 2 Theilen Wasser	21,60 mg	10,74 mg				11,90 mg

Enzymwirkung ebenfalls im Darrmalzauszug, indem dabei sowohl eine Selbstpeptonisirung wie auch eine Umbildung des Weizenglutins eintritt; 2. dass ein geringer Gehalt an Milchsäure einen stark beschleunigenden Einfluss hat; 3. dass Kochen das Enzym zerstört und 4. dass eine gewisse Proportionalität zwischen den Enzymwirkungen und der Menge des im Auszug sich findenden Stickstoffes existirt (vgl. Stickstoffgehalt und Enzymwirkungen im Grünmalzauszug).

Demnach musste man annehmen, dass das Enzym ebenfalls unter dem Brauprocess sowohl auf gelöste wie ungelöste Eiweissstoffe wirkte, und es war deshalb von grösstem Interesse, diese Wirkungen so weit wie möglich unter denselben Versuchsbedingungen zu verfolgen, wie sie in der Brauerei vorgefunden werden, jedoch mit den Modificationen, welche die Laboratoriumversuche bedingen, und mit solchen Parallelversuchen, die zu einem fernerem Verständnisse des Processes führen könnten. Ich stellte deshalb u. A. folgende Maischversuche an: Zu jedem dieser Versuche wurden 50 g fein gemahlenes Malz verwendet, welchem 200 ccm. im Voraus zur betreffenden Temperatur erwärmtes Wasser zugesetzt wurden. Die Mischung wurde in einem Maischbecher ins Wasserbad gebracht und ca. alle 10 Minuten umgerührt. Je nachdem das Wasser verdampfte, wurde es wieder aufgefüllt.

Nach dem Maischen wurde der Inhalt in 250 ccm. Messkolben gegossen, es wurde bis zur Marke mit Wasser aufgefüllt und mit Chloroform gesättigt (um eine möglicher Weise begonnene Milchsäuregährung zu sistiren oder zu verhindern). Darauf wurde filtrirt und das Filtrat zurückgegossen, bis es völlig klar durch ein gewöhnliches Filtrum hindurchlief; dem Filtrate wurden dann Proben entnommen je 10 ccm. zu den verschiedenen Bestimmungen (Säurebestimmungen, Total-N und peptonisirter N). Es wurden hier, wie in allen vorhergehenden Fällen, Doppelversuche angestellt und Doppelbestimmungen vorgenommen. Die angeführten Zahlen sind in der Regel Mittelzahlen der 2 Bestimmungen. — Ebensowenig wie ich die

werde ich die Resultate eingehender discutiren, sondern mich mit Auszügen meiner Versuchsprotokolle begnügen (eine ausführliche Bearbeitung wird später erscheinen).

Die angeführten Zahlen sind umgerechnet pr. 100 g Malz (500 ccm.). Die Acidität ausgedrückt durch die Anzahl von ccm.  $\frac{1}{10}$  normaler Natronlauge, welche zur Neutralisation von 500 ccm. der Würze ausreicht.

# I. Maischen bei den gewöhnlichen Brautemperaturen.

Bei den Parallelversuchen wurde mit Chloroform gesättigt, das ja einen schwächenden Einfluss auf die Peptase hat. Wenn diese hier etwas geringer als in früheren Versuchen erscheint, kommt es sicherlich daher, dass sich in dem zerquetschten Malz viele intacte Zellen befinden, in welche das Chloroform nicht einzudringen und das Enzym zu zerstören vermag. Zum Vergleich wird ein Maischversuch bei 0° in einer Stunde (unter Umrühren) angeführt.

	Ohne Chloroform				Mit Chloroform gesättigt			
	Acidität	Total-N	Pept. N	$\frac{1}{10}$ Pept. N	Acidität	Total-N	Pept. N	$\frac{1}{10}$ Pept. N
		mg	mg	%				
Kiehwasser (0°) 1 St. . . .	67,5	480,5	245	51,0				
1 $\frac{3}{4}$ St. bei 35° . . . .	90	561,5	329	58,6	75	456,5	303	66,4
1 $\frac{3}{4}$ St. b. 35° + 1 $\frac{1}{2}$ St. b. 50°	130	638,5	414	66,4	107	526,0	356	67,6
1 $\frac{3}{4}$ St. b. 35° + 1 $\frac{1}{2}$ St. b. 50° + 1 St. b. 62,5° . .	152,5	665,0	464	69,8	120	576,0	416	72,2

Man sieht demnach, dass unter dem Brauprocess eine recht bedeutende Peptonisirung stattfindet, und dass nicht allein die Menge des Totalstickstoffes, der ausgezogen wird, sondern auch die procentische Menge des peptonisirten N steigt. In den gewöhnlichen Auszügen von Grünmalz (siehe S. 85) befinden sich in der Regel nur 52—53% vom Total-

stickstoff in peptonisirtem Zustand und hier im Versuche bei 0° gleichfalls nur 51%, während diese unter dem Maischen bis auf nahezu 70% steigen, obwohl die Totalstickstoffmenge gleichzeitig bedeutend gestiegen ist. Die Menge der freien Säure spielt sicherlich hier eine wichtige Rolle (unter dem Maischen wird vielleicht durch Gährung eine geringe Menge freier Milchsäure gebildet), weil sie sowohl mehr von dem vorhandenen Eiweissstoff auflöst, als auch die Wirkung des Enzyms befördert. Hierauf deuten ebenfalls die folgenden Versuche, in welchen 0,2% Salicylsäure zugesetzt war, obwohl das Enzym bei den hohen Temperaturen hier geschwächt sein musste.

II. Maischen in 4<sup>1</sup>/<sub>4</sub> Stunden bei constanter Temperatur, mit und ohne Chloroform oder Salicylsäure.

		Acidität	Total-N	Pepton. N	%, Pept. N
62,5°	{ Ohne Zusatz . . . . .	135	629,0 mg	433 mg	68,8 %
	{ Mit Chloroform gesättigt	125	473,5 >	328 >	69,3 %
	{ Mit 0,2 % Salicylsäure	167,5	698,5 >	550 >	78,7 %
70°	{ Ohne Zusatz . . . . .	125	544,5 >	351 >	64,5 %
	{ Mit Chloroform gesättigt	107	407 >	264 >	64,9 %
	{ Mit 0,2 % Salicylsäure	170	605,5 >	409 >	67,55 %

Auch diese Versuche lasse ich vorläufig für sich selber reden.

III. In den nachfolgenden Versuchen ist untersucht worden, wie das Peptonisiren vor sich geht, wenn während der ganzen Zeit bei constanter Temperatur gemischt wird, und welche von 4 beispielsweise unter den Brauprocessen anzuwendenden Temperaturen sowohl die grösste Menge des Totalstickstoffes, als auch des peptonisirten Stickstoffes ergibt. Um den zeitgemässen Verlauf des Processes zu verfolgen, sind die Parallelversuche nach verschiedenen Zeiträumen abgebrochen worden, und zum Vergleich wird hier ein Versuch bei 0° in 4<sup>1</sup>/<sub>4</sub> Stunden angeführt.



	Temperatur	Resultat	Total N	Pept. N	Unbeeinflusstes N	% Pept. N
0°	4 1/4 Stunden	75	424 mg	202 mg	222 mg	47,7 %
35°	1 1/4 "	97,5	543 "	274 "	269 "	50,5 %
	3 1/4 "	119,0	589 "	302 "	287 "	51,3 %
	4 1/4 "	122,5	593 "	327 "	266 "	55,1 %
50°	1 1/4 "	115,0	590 "	373 "	217 "	63,2 %
	3 1/4 "	145,0	616 "	388 "	228 "	63,0 %
	4 1/4 "	120,0(?)	641,5 "	406 "	235,5 "	63,3 %
62,5°	1 1/4 "	110,0	509 "	319 "	190 "	62,7 %
	3 1/4 "	115,0	534 "	343 "	191 "	64,2 %
	4 1/4 "	130,0	551 "	357 "	194 "	64,8 %
75°	1 1/4 "	145,0	398,5 "	235 "	163,5 "	56,5 %
	3 1/4 "	137,5	435 "	254 "	181 "	58,4 %
	4 1/4 "	117,5	432 "	256 "	176 "	59,1 %

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei 50° sowohl mehr Totalstickstoff ausgezogen als auch peptonisirter N gebildet wird als bei den anderen Temperaturen. Das stimmt mit den angeführten Versuchen überein, nach welchen das Temperaturoptimum für die Wirkung der Peptase bei 47—48° liegt. Der Zusatz einer geringen Menge freier Säure würde sicherlich in hohem Grade das Peptonisiren beschleunigen. Einige hierüber angestellte Versuche gaben folgende Resultate:

100 g Malz + 400 ccm. Wasser	Total-N	Pept. N	Unbeeinflusstes N	Pept. N	Vermehrung des		
					Total-N	Pept. N	Unbeeinflusstes N
	mg	mg	mg	%	mg	mg	mg
Nach 2 Stunden bei 5°	429	236	193	55,0	195	150	45
„ 2 „ „ 47°	624	386	238	61,8			
100 g Malz + 400 ccm. Wasser mit 0,2% Milchsäure							
Nach 2 Stunden bei 5°	458	273	185	59,6	394	304	90
„ 2 „ „ 47°	852	577	275	67,7			

Peptase während des Brauprocesses wirkt und dass sie in hohem Grade für den Gehalt des Bieres an stickstoffhaltigen Bestandtheilen bestimmend ist. Die nicht peptonisirten Eiweissstoffe werden vielleicht zum grössten Theil im Hopfenkessel und durch die anderen Erwärmungsprocesses, denen die Würze und das Bier unterzogen werden, ausgefällt, jedoch bleiben da die durch den Einfluss der Peptase gebildeten Zersetzungsprodukte der Eiweissstoffe übrig, von denen ein grosser Theil zur Ernährung der Hefe gebraucht wird.

Wenn nun unter dem Maischen ein proteolytischer Process vor sich geht, ist es klar, dass das betreffende Enzym die Erwärmung, durch welche das Grünmalz zum Darrmalz wurde, ertragen hat. Ich versuchte nun, ob ein Grünmalzauszug ebenfalls das Eindampfen zur Trockne aushielt. Nach sehr beschwerlichem und langwierigem Eindampfen bis ungefähr zur Trockne im Vacuum bei 20—30 mm. Quecksilberdruck und bei einer zwischen 30° und 50° schwankenden Temperatur wurde der Extract schliesslich in 4 Tagen im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet und darauf pulverisirt. Eine Lösung von 4% dieses Pulvers peptonisirte in 1½ Stunden bei 45° von einer milchsauren Glutininlösung 2,84 mg N, eine 8%ige Lösung ungefähr das Doppelte, nämlich 5,16 mg N. Es blieb demnach noch ein recht bedeutendes peptonisirendes Fermentirungsvermögen übrig, was sich jedoch verlor, als das Pulver 22 Stunden bei 95° gehalten worden war.

Ausser den hier genannten sind mehrere andere Verhältnisse bei den Wirkungen der Peptase untersucht, wie die Abhängigkeit der Enzymmenge und der Zeit, der Einfluss des Frierens, Alters, Lichtes und des Alkohols, ferner wie viel diffusibeler Stickstoff gebildet wird u. s. w. Da aber einige dieser Versuche noch nicht abgeschlossen sind, und mehrere von ihnen ein specielleres Interesse besitzen, habe ich dieselben hier nicht erwähnt. Da hier ausserdem eine Reihe anderer Fragen vorliegt, die der Erörterung bedürfen, und einige der schon behandelten weiter ausgeführt werden sollen, muss ich ebenfalls in Betreff der Details bei

Bearbeitung meines Themas hinweisen, welche in den «Mittheilungen vom Carlsberg-Laboratorium» erscheinen wird. Die hier mitgetheilten Facta dürften vielleicht auf einiges Interesse rechnen im Anschluss an die von Windisch und Schellhorn, sowie einige andere im Laufe dieses Sommers veröffentlichten Berichte.

## II. Das coagulirende Enzym (Lab).

Ausser dem proteolytischen habe ich inzwischen ebenfalls ein eiweisscoagulirendes Enzym (Lab) im Malz nachgewiesen. In meinen ersten Versuchen über die Einwirkung der Peptase auf Gluten («Kleber») beobachtete ich, dass dieses sich immer wie ein Coagulum kurz nach dem Zusatz von Malzauszug sammelte, und dieses geschah fast augenblicklich, nach weniger als dem Verlauf von 5 Minuten sowohl bei 50° als auch bei gewöhnlicher Temperatur. Ich untersuchte darauf, in welcher Weise der Malzauszug auf Milch wirkte. Zu 25 ccm. Milch kam 10 und 20 ccm. frischer Malzauszug (aus 1 Theil zerquetschtem Malz und 2 Theilen Wasser bereitet) und zur Kontrolle 20 ccm. Malzauszug, der im Voraus bis zum Kochen erwärmt war. Nach Verlauf einer Stunde war die Milch mit den 20 ccm. ungekochten Malzauszug coagulirt, nach 2 Stunden die Proben mit 10 ccm. Dagegen war nach ungefähr 5½ Stunden Coagulation noch nicht in der Kontrolle eingetreten. In den beiden ersten Versuchen sammelte sich das Casein auf dem Boden unter einer überstehenden klaren Flüssigkeit.

Dass die Enzymmenge hier nicht nur für die Schnelligkeit, mit welcher die Coagulation zu Stande kommt, von Bedeutung war, sondern auch entscheidend war, ob dieselbe überhaupt eintritt, zeigen folgende Versuche mit einer Kleberlösung. Die Versuche wurden bei gewöhnlicher Zimmertemperatur angestellt und begannen 3 Uhr 52 Minuten. Um 3.56 coagulirte die erste Probe, 3.58 die zweite, die dritte und vierte Probe coagulirte weder an diesem noch am folgenden Tage. An das Licht gehalten sah man die vorwärtsschreitende

Coagulum sammelte sich allmählich auf dem Boden, während die darüber stehende Flüssigkeit klar wurde. In den entsprechenden Versuchen bei 50°, welche vom 22. XI. 1898 4 Uhr bis 23. XI. 9.30 Vormittags dauerten, fand eine geringe Fällung in den Gläsern mit 5 und 2 ccm. Malzauszug statt; die darüberstehende Flüssigkeit war jedoch nicht klar wie in den Proben mit 20 und 10 ccm.; dieselbe hatte den opalisirenden Schein der Kleberlösung; wahrscheinlicher Weise war nicht genügend Enzym zugegen gewesen, um allen Kleber auszufällen.

---

# Beiträge zur Physiologie des Kreatinins.

Erste Mittheilung.

Von

cand. med. **Adalbert Gregor.**

Aus dem Laboratorium für angew. med. Chemie des Prof. Dr. Löbisch in Innsbruck.

---

(Der Redaction zugegangen am 20. September 1900.)

---

Die in meiner Arbeit «Ueber den Einfluss des Alkohols auf die Ausscheidung der reducirenden Substanzen im Harn»<sup>1)</sup> festgestellte Thatsache, dass der Genuss alkoholischer Getränke eine ausschliesslich auf ihren Alkoholgehalt zurückzuführende Vermehrung der reducirenden Substanzen des Harnes herbeiführe, legte unmittelbar die Frage nach der Art dieser Körper nahe. Sollen wir hier an die Entstehung einer alimentären Glycosurie denken oder eine Vermehrung der im normalen Harn vorkommenden reducirenden Substanzen annehmen? Letztere Vorstellung liegt um so näher, als die Ansicht, Glycose sei ein normaler Harnbestandtheil, in neuester Zeit durch Lohnstein<sup>2)</sup> heftigen Angriff erfahren hat. Von den in dieser Richtung charakterisirten Substanzen kämen in erster Linie die Harnsäure und das Kreatinin in Betracht, weil ihre normale Ausscheidung hinreichend ist, um sie als einen Hauptbestandtheil der reducirenden Substanzen vermuthen zu lassen, und weil die bekannten Schwankungen ihrer Menge genügen könnten, wesentliche Schwankungen in der Gesamt-reduction zu erklären.

Wie ich empirisch fand, reduciren 0,2175 g Harnsäure 100 ccm. Peska'scher Lösung. Die Reduktionskraft derselben beträgt demnach 0,3706 von der des Traubenzuckers, auf

---

1) Wiener klin. Wochenschrift 1900 Nr. 16.

2) Allg. Med. Central-Ztg. 1900 Nr. 30 u. ff.

welchen die Ausscheidung an reducirenden Substanzen stets bezogen wird. Wir könnten also vermuthen, dass, da bekanntermaassen die normale Harnsäureausscheidung 0,7—1 g beträgt, 6—10% der Gesamtmenge an reducirenden Substanzen (ca. 3,3 g) Harnsäure seien. Ich glaube aber, dass eine starke Beeinflussung der Gesamtreduction durch die Harnsäure ausgeschlossen werden darf. Da die Harnsäure durch Kupferoxyd viel schwieriger und langsamer reducirbar ist als die übrigen in Betracht kommenden Harnbestandtheile, speciell die Glycose, kann bei Ausführung der Peska'schen Titration die noch nicht zerstörte Harnsäure sich mit dem anderweitig gebildeten Kupferoxydul zu der bekannten unlöslichen Verbindung vereinigen, welche nicht weiter angegriffen wird. Man sieht auch demzufolge bei Anstellung der Titration mit Harnsäure oder harnsäurereichem Harne den weissen Niederschlag sich bald bilden und bis zum Ende der Reaction ungelöst persistiren (die Erdphosphate müssen dabei natürlich ausgeschlossen werden). Es sei hierbei ausdrücklich bemerkt, dass das Gesagte nur für die Untersuchung der Reductions-fähigkeit nach der Methode von Peska gilt, was also für sie in dieser Hinsicht einen Vorzug bedeuten mag.

Was nun das Kreatinin anlangt, werden nach meiner Berechnung 100 ccm. Peska'scher Flüssigkeit durch 0,1195 g dieser Substanz reducirt, während zur Reduction der gleichen Flüssigkeitsmenge 0,0802 g Traubenzucker erforderlich sind. Es beträgt daher die reducirende Kraft des Kreatinins 0,6711 von der des Traubenzuckers; ein Werth, der auch annähernd mit der Angabe Johnsohn's übereinstimmt, nach welcher 4 Moleküle natürlichen und 5 Moleküle künstlichen Kreatinins Fehling'sche Lösung so stark wie 2 Moleküle Traubenzucker reduciren. Da also für natürliches Kreatinin die reducirende Kraft 0,77 der des Traubenzuckers, für künstliches 0,6 beträgt, so verhält sich die reducirende Kraft des von mir aus Harn dargestellten Kreatinins gegen Peska'sche Flüssigkeit, wie das Mittel aus dem künstlichen und natürlichen Johnsohn's gegen Fehling'sche Lösung. Da nun die Ausscheidung an reducirenden Substanzen im normalen Harne bezogen auf Trauben-

Kreatinin 0,5 bis 1,5 g betrug, ist natürlich an eine Reducirung der reducirenden Substanzen mit dem Kreatinin nicht zu denken, aber damit auch nicht gesagt, dass die unter gewissen Umständen gefundene Steigerung in der Ausscheidung reducirender Substanzen nicht etwa durch Aenderungen in der Kreatininproduktion bedingt werde. Die Frage liesse sich bei genauer Kenntniss der Ausscheidungsverhältnisse des Kreatinins entscheiden, allein schon die weiter unten des Näheren zu besprechenden Angaben der Autoren über den Einfluss der Muskelthätigkeit, die, wie ich nachgewiesen,<sup>1)</sup> ein Sinken der reducirenden Substanzen im Gefolge hat, auf die Kreatininausscheidung liess mich die Nothwendigkeit erkennen, in eigens daraufhin gerichteten Untersuchungen die spärlichen Litteraturangaben zu ergänzen.

Für die quantitative Bestimmung des Kreatinins kommt heute einzig und allein das umständliche Verfahren Neubauer's und seine von Salkowski<sup>2)</sup> vorliegende Modification in Betracht, da die Methode Kolisch's,<sup>3)</sup> die auf der Fällung des Kreatinins durch Quecksilberchlorid nach Johnson begründet ist, von vornherein ausgeschlossen werden muss, weil, wie Huppert hervorhebt, ein weiterer Zusatz von Quecksilberchlorid neue Fällungen mit sich bringt und nach einer Angabe Wörner's<sup>4)</sup> der Niederschlag auch noch andere stickstoffhaltige Substanzen enthält. Neubauer's und Salkowski's Methode differiren vor Allem darin, dass Neubauer den durch Chlorcalcium gefällten Harn mit Mineralsäuren anzusäuern empfiehlt, offenbar in der Befürchtung, dass in alkalischer Lösung das Kreatinin in Kreatin übergehe, während Salkowski einen ganz kleinen Alkaliüberschuss beim Ausfällen erlaubt, der beim Eindampfen schwinden soll, so dass dann in

---

1) «Ueber die quantitative Bestimmung der reducirenden Substanzen im Harn nach dem Verfahren von Zdenek Peska», Centralblatt für Krankheiten der Harn- und Geschlechtsorgane, X. Bd., Heft 5, S. 254 ff.

2) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. X.

3) Centralblatt für innere Medicin 1895, S. 265—269.

4) Zeitschrift für physiologische Chemie Bd. XXVII.

neutraler oder schwach saurer Lösung gearbeitet würde. Von vornherein wäre Neubauer's Verfahren zu billigen, allein nach meinen Erfahrungen bringt das Ansäuern, sei es mit mineralischen, sei es mit organischen Säuren, es mit sich, dass nach dem Zusatze der alkoholischen Chlorzinklösung zum kreatininhaltigen Alkoholextract keine Kreatininfällung zustande kommt. Wir müssen uns daher hier dem Vorschlage Salkowski's anschliessen, aber bloss auf den von ihm erbrachten Nachweis hin, dass bei seiner Methode nur Verluste von wenigen Centigrammen zu fürchten sind; denn eigentlich wären grössere Schäden zu gewärtigen, da seine Angabe, dass die schwache Alkalescenzenz schwinde, der alten Erfahrung widerspricht, wonach Harn durch Kochen alkalisch wird. Thatsächlich konnte ich auch einen auffälligen Umschlag der Reaction nie wahrnehmen und es wird eben im besten Falle in neutraler Lösung gearbeitet.

Daneben bringt das Verfahren Salkowski's noch einige praktische Abänderungen der alten Methode, aber es bleiben trotzdem auch an ihm ganz wesentliche Mängel haften. So bisweilen das Ausfallen eines flockigen Niederschlages nach dem Zusatze der Chlorzinklösung, selbst nach vorheriger sorgfältigster Ausfällung mit Chlorcalcium. Diesem Uebelstande nach Voit's Vorgänge zu begegnen, der sich durch einfaches Abfiltriren zu helfen sucht, scheint mir etwas gewagt zu sein, denn fürs Erste fehlt die Sicherheit, dass dieser Niederschlag selbst kein Kreatinin enthalte, und dann ist die Entstehung desselben durchaus nicht unmittelbar an den Chlorzinkzusatz gebunden, sondern bildet oft erst eine Ueberraschung nach dem vorgeschriebenen Stehenlassen über Nacht. Soll nun jetzt auch noch abfiltrirt werden? Sammt den Krystallen, die vielleicht im amorphen Niederschlage verborgen sind? Ein weiterer Mangel, der beiden Methoden anhaftet, ist die Chlornatriumausscheidung während der Entwicklung der Kreatininchlorzinkkrystalle. «Um die Bestimmung in solchen Fällen noch zu retten», empfiehlt Salkowski die alkoholische Flüssigkeit abzugliessen und mit einigen Tropfen Wasser die Chlornatriumkrystalle zu entfernen. Thatsächlich ist aber die Bestimmung



ment nicht zu retten, denn es ist nicht ausgemacht, dass eine geringe Löslichkeit des doch nicht ganz reinen Kreatininchlorzinks in Wasser besteht, zumal da eine Auflösung der Chlornatriumkrystalle nicht sofort erfolgt.

Wir sind also durch diese Umstände darauf hingewiesen, die Wägungen bei der Kreatininbestimmung zu umgehen, und ich möchte daher zwei Verfahren vorschlagen, die sich mir bei meinen Untersuchungen in dieser Hinsicht als zweckmässig erwiesen. Das eine benutzt die früher angeführte Eigenschaft des Kreatinins, Peska'sche Flüssigkeit zu reduciren, zu seiner quantitativen Bestimmung, und zwar werden, wie ich ermittelte, 100 ccm. dieser Lösung durch 0,1195 g Kreatinin reducirt. Doch empfiehlt es sich, wegen der im Verhältniss zur Dextrose immerhin geringeren Reduktionskraft des Kreatinins kleinere Mengen von Reduktionsflüssigkeiten zu wählen, wie ich es für die Reduktionsbestimmung mit niedrig gestellten Harnen angab.<sup>1)</sup>

Das andere Verfahren beruht darauf, den Kreatiningehalt aus dem Stickstoffgehalte der ausgeschiedenen Kreatininchlorzinkmasse zu berechnen. Der von mir eingeschlagene Weg bestand daher im Folgenden:

Ich verfuhr bis zur Ausfällung des Kreatininchlorzinkes genau nach Salkowski, indem ich namentlich durch Vermeidung übermässigen Kalkzusatzes das Erhalten einer nur eben noch alkalischen Reaction anstrebte. Die zur Kreatininfällung bestimmten 200 ccm. alkoholischer Kreatininlösung wurden in ein passendes gewogenes Kölbchen gethan und dasselbst die Chlorzinkfällung vorgenommen. Nach der Ausscheidung der Kreatininchlorzinkkrystalle, welche 2—3 Tage in Anspruch nahm, wurde die Flüssigkeit durch ein Wägeröhrchen von bestimmtem Gewichte abgegossen, Kolben und Wägeröhrchen entsprechend getrocknet und wieder gewogen. Als Kontrolle oder gleich von vornherein wurde die durch Chlorzink ausgefällte Masse in mit etwas Schwefelsäure angesäuertem Wasser gelöst und auf 100 ccm. gebracht. Hier- von wurden 50 ccm. zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeld-

---

1) Wiener klinische Wochenschrift, 1900, Nr. 16.

dahl verwendet und der Kreatiningehalt aus dem Stickstoffwerthe berechnet, der Rest des aufgelösten Niederschlages diente zur Titration nach Peska. Es sei bemerkt, dass bei der Titration mit Kreatinin eine längere Reactionszeit bis zum Eintritte des Farbumschlages erforderlich ist, als bei der Titration von Zucker.

Den Grad der Uebereinstimmung der drei Methoden mögen folgende Zahlen illustriren.

	Kreatinin, bestimmt durch Wägung	Kreatinin, berechnet aus Stickstoff	Kreatinin, bestimmt durch Reduction
1.	0,1966	0,1942	0,2098
2.	0,1665	0,1686	0,1636
3.	0,1922	0,1966	0,1912
4.	0,2104	0,2154	0,2080

An der Hand dieser Methoden ging ich an die Lösung der oben aufgeworfenen Frage, die sich bei Nichtberücksichtigung der Harnsäurewirkung dahin zuspitzte: Ist die Vermehrung der Reduction nach Alkoholgenuss durch eine Steigerung der Kreatininausscheidung bedingt, oder die Annahme einer alimentären Glycosurie in diesem Falle gerechtfertigt?

Bevor ich aber auf die Besprechung derselben eingehe, möchte ich noch die Beziehungen der Kreatininausscheidung zur Ausscheidung der reducirenden Substanzen im Allgemeinen erörtern, da dieses Verhältniss bis jetzt noch keinerlei Würdigung erfahren zu haben scheint. Da die reducirende Kraft des Kreatinins 0,6711 der des Traubenzuckers beträgt, die tägliche Kreatininausscheidung nach meinen Versuchen mit 1 g im Mittel angeschlagen ist und täglich durchschnittlich 3 g reducirende Substanzen ausgeschieden werden, so ist 21,37% der Gesamtreduction bei normalen Verhältnissen durch die Reduction des Kreatinins verursacht. Da nun aber die Kreatininausscheidung unter gleichen äusseren Verhältnissen eine ziemlich constante bleibt, so sind von dieser Seite keine Schwankungen der Reduction bedingt. Anders liegt die Sache, wo durch besondere Umstände eine wesentliche Veränderung

insbesondere nach dem Genusse stickstoffarmer oder kreatininfreier Nahrung einen entschiedenen Abfall an reducirenden Substanzen; derselbe trat dann auch in Wirklichkeit ein, doch ging die Verminderung der Menge reducirender Substanzen nicht mit der Kreatininabnahme streng parallel einher, so dass ich auf Grund der his jetzt angestellten Versuche noch nicht entscheiden möchte, wie viel von der so erzielten Verminderung an reducirenden Substanzen auf Kosten der Kreatininabnahme, wie viel auf Kosten eines anderen, vorderhand noch nicht näher zu bezeichnenden Factors zu setzen sei. Wesentlich durchsichtiger liegen die Verhältnisse in den Fällen, in welchen eine Vermehrung der Kreatininausscheidung besteht. So vor Allem bei dem Genusse reiner Fleischkost. Es ist eine seit Voit's Untersuchungen<sup>1)</sup> geläufige Thatsache, dass der Genuss von Fleisch eine Steigerung der Kreatininmenge im Harn nach sich zieht, da das im Fleische zu ca. 0,25% enthaltene Kreatinin ebenso unverändert abgeschieden wird, wie das Versuchs halber eingenommene. Nun konnte ich aber den Nachweis führen,<sup>2)</sup> dass ausschliessliche Fleischnahrung keine Vermehrung der reducirenden Substanzen nach sich zieht, und man wird daher zur Annahme geführt, dass in diesem Falle eine entgegengesetzte Einwirkung auf die Ausscheidung der reducirenden Substanzen und des Kreatinins statthabe. Derselbe Gegensatz tritt uns aber auch entgegen, wenn wir die Ausscheidung von Kreatinin und reducirenden Substanzen nach energischer Muskelthätigkeit vergleichen. Dass Muskellarbeit keine Vermehrung, ja geradezu eine Verminderung an reducirenden Substanzen bedingt, betonte ich bereits in einer früheren Arbeit<sup>1)</sup>; dass der gleiche Factor eine Vermehrung des Kreatinins zur Folge habe, soll unten näher auseinander gesetzt werden. Vorgehend möchte ich aber schon hier einige Resul-

---

1) Ueber das Verhalten des Kreatins, Kreatinin und Harnstoffs im Thierkörper. Zeitschrift für Biologie, Bd. IV.

2) Centralblatt für die Krankheiten der Harn- und Geschlechtsorgane, Bd. X, Heft 5, S. 254.

3) l. c., S. 254 u. 256.

tate anführen, welche die in Rede stehenden Beziehungen illustriren.

Die gleichzeitige Untersuchung des Kreatinins und der reducirenden Substanzen ergab bei einem derartigen Versuche an vier aufeinanderfolgenden Tagen nachstehende Werthe:

Datum	Reduc. Subst. bezog. auf Traubenzucker in g	Kreatinin in g	Anmerkung
19. Mai	3,5269	0,9951	Muskelthätigkeit
20. „	3,5318	1,3067	
21. „	3,1528	1,4569	
22. „	—	0,9511	

Man ersieht daraus, dass, da die Ausscheidung an reducirenden Substanzen constant bleibt, die Kreatininmenge aber eine starke Steigerung erfahren hat, eine Verminderung der neben dem Kreatinin die Reduction verursachenden Substanzen stattgefunden hat; denn nach Abzug desjenigen Theiles von der Gesamtreduction, welcher durch die Kreatininvermehrung bedingt ist, lauten die Werthe der reducirenden Substanzen:

Datum	Reducirte Substanz	Anmerkung
19 Mai	3,5269	Muskelthätigkeit
20 „	3,3230	
21 „	2,8434	

Ein Absinken der Reductionsmenge ist also klar ersichtlich. Dieses Verhalten der reducirenden Substanzen darf uns im Grunde genommen auch durchaus nicht Wunder nehmen, da es eigentlich nichts Anderes ist, als der Ausdruck einer bei der Diabetes-Therapie geläufigen Erfahrung, nach der durch vorwiegende Fleischkost und lebhaftes Muskelthätigkeit eine Verminderung der Zuckerausscheidung erzielt wird.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> E. Külz, Beiträge zur Pathologie und Therapie des Diabetes mellitus. Marburg 1874.

Albu, Ueber Einfluss starker Muskelthätigkeit (Radfahren) auf Diabetes. Berl. klin. Wochenschrift 1899, 11 u. 12.

Ein analoges Verhalten der reducirenden Substanzen muss unter der Annahme des constanten Auftretens von Dextrose im normalen Harn geradezu gefordert werden.

In keinerlei Widerspruch zu den Versuchen, welche eine Vermehrung des Kreatinins unter gleichzeitiger Verminderung der reducirenden Substanzen ergaben, steht die Beobachtung, dass, falls die Ausscheidung an reducirenden Substanzen in Folge mangelhafter Nahrungszufuhr eine Art Minimum erreicht hat, dass dann eventuelle Schwankungen in der Kreatininausscheidung zur Geltung kommen.

Ein solcher Fall liegt in folgendem Versuche vor:

Datum	Reduc. Subst. bezog. auf Traubenzucker in g	Kreatinin in g	Anmerkung
31. Juli	2,6004	0,3550	Muskelthätigkeit
1. August	2,7706	0,6329	
2. „	2,5329	0,3572	

Die Menge von 2,6004 g reducirender Substanzen bedeutet gegenüber der Norm eine beträchtliche Herabsetzung; das Gleiche gilt auch für die Kreatininausscheidung des ersten Tages. Am zweiten Tage findet eine Kreatininvermehrung um 0,2779 g statt. Diesem Ueberschusse entspricht eine Reduction von 0,1865 g Dextrose. Nun beträgt aber die Vermehrung der Reduktionsmenge an diesem Tage gegenüber dem vorhergehenden 0,1702 g Dextrose. Man muss also eine Steigerung der Reduction durch Vergrößerung der Kreatininausscheidung annehmen, da an eine entsprechende Variation eines dritten Factors bei diesen Versuchsbedingungen nicht zu denken ist, um so weniger, als der nächste Tag (2. August) ein paralleles Absinken reducirender Substanzen und Kreatinins zeigt.

Dextrose als normalen Harnbestandtheil wieder vorausgesetzt, würde die Erklärung des scheinbar dem ersten Resultate widersprechenden Versuches lauten: Durch die ungenügende Ernährung ward die Dextroseausscheidung auf ihr Minimum herabgesetzt, die dieselbe sonst vermindernde Muskelaction

konnte also keine weitere Veränderung mit sich bringen und die gleichzeitig verursachte Steigerung der Kreatininausscheidung musste also eine Vermehrung der Gesamtreduction mit sich bringen.

Wie liegen nun die gegenseitigen Verhältnisse bei der durch Alkoholgenuss gesetzten Veränderung in der Ausscheidung der reducirenden Substanzen? Kann zur Erklärung der Reductionssteigerung auch hier eine Vermehrung der Kreatininmenge geltend gemacht werden? Nach dem im Vorhergehenden Gesagten erscheint diese Vorstellung allerdings ziemlich unwahrscheinlich, wenn auch die Verfechter der Ansicht, dass der Alkoholgenuss eine Stickstoffvermehrung des Harnes im Gefolge hat, sie durchaus plausibel finden mögen, aus der Stickstoffvermehrung auf Eiweisszerfall — Muskeinschmelzung — d. i. Freiwerden von Kreatinin schliessend.

Zur Entscheidung der Frage unternahm ich zunächst folgenden Versuch: Nachdem ich durch regelmässige quantitativ und qualitativ gleichbleibende Nahrung eine annähernd constante Ausscheidung an reducirenden Substanzen erzielt hatte, nahm ich ausser der gewöhnlichen Kost noch Mittags und Abends an einem Tage je 500 ccm. dunkles Bier ein.

Das Ergebniss des Versuches lautet:

Datum	Harn- menge in ccm.	Specificsches Gewicht	Reduc. Subst. bezog. auf Traubenzucker in g	Kreatinin in g	An- merkung
25. Juni	1092	1,022	3,3928	—	Biergenuss
26. „	1246	1,025	3,3535	0,8430	
27. „	1898	1,016	4,1850	0,8408	
28. „	1320	1,020	3,8660	0,8705	
29. „	998	1,026	3,3592	—	

Wie aus den Zahlen unmittelbar zu entnehmen ist, bleibt die Kreatininmenge unter dem Einflusse des Bieres unverändert, während die Reduction eine bedeutende Steigerung (0,8315 g = 24,74%) erfährt.

Eine Wiederholung des Versuches ergab das Resultat:

Datum	Harn- menge in ccm.	Specificsches Gewicht	Reduc. Subst. bezog. auf Traubenzucker in g	Kreatinin in g	An- merkungen
22. Juli	1265	—	3,2009	—	
23. „	962	1,026	3,5933	1,3457	
24. „	1112	1,025	3,7429	1,0127	Biergenuss
25. „	1010	1,025	3,3299	0,9025	
26. „	1900	1,016	3,9349	0,6303	Biergenuss
27. „	1110	1,023	3,5875	0,8941	

Weit entfernt, die Kreatininmenge zu steigern, ruft der Alkoholgenuss sogar ein entschiedenes Sinken derselben hervor. Der Grund ist naheliegend. Der ungewohnte Alkoholgenuss<sup>1)</sup> mit seinen nichts weniger als wohlthuenden Wirkungen auf den Organismus, hatte eine Verminderung der Appetenz, sehr verminderten Fleischgenuss und daher auch eine Abnahme des Kreatinins im Harne zur Folge. Dass bei regelmässigem und gewohntem Biergenusse, vielleicht auch schon beim Genusse extractärmerer alkoholischer Getränke die Kreatininausscheidung ebenso constant bleiben dürfte, wie bei mir im ersten Versuche, in dem ich auf gleichmässige Nahrungsaufnahme achtete, erscheint mir sehr wahrscheinlich. Weniger eindeutig als die Kreatininwerthe könnten aber die Ausscheidungen an reducirenden Substanzen gefunden werden. Der Alkoholeinfluss auf dieselben wird aber sofort ersichtlich, wenn man in Anbetracht der Schwankungen des Kreatinins von der jedesmaligen Gesammtreduction denjenigen Theil abzieht, der durch die Kreatininreduction bedingt war. Die Zahlen lauten dann:

Datum	Reducirende Sub- stanzen nach Abzug der Kreatininreduc- tion bezogen auf Traubenzucker in g	An- merkungen
23. Juli	2,6802	
24. „	3,0633	Biergenuss
25. „	2,7242	
26. „	3,5120	Biergenuss
27. „	2,9874	

<sup>1)</sup> Verfasser trinkt ausser zu Versuchszwecken Alkohol in keiner Form.

Die Reduction steigt nach dem ersten Biergenusse um 0,3831 g = 14,3%, nach dem zweiten um 0,7878 g = 28,9%.

Es erweist sich sonach auch hier die Steigerung in der Ausscheidung von reducirenden Substanzen unabhängig von der Kreatininausscheidung.

Endlich unternahm ich es noch, die Ausscheidung des Kreatinins und die der reducirenden Substanzen unter Berücksichtigung der Gesamtstickstoffausscheidung unter jenen Verhältnissen zu prüfen, die, wie oben angeführt, sichtlich eine Beeinflussung der Reduction durch das Kreatinin ergab.

Durch knappe, möglichst stickstoffarme Kost suchte ich die Ausscheidung reducirender Substanzen herabzudrücken und prüfte dann den Einfluss des Bieres, den folgende Zahlen veranschaulichen:

Datum	Harnmenge in ccm.	Spec. Gewicht	Reduc. Subst. bezog. auf Traubenzucker in g	Kreatinin in g	Gesamtstickstoff	Anmerkung
29. Juli	1240	1,023	2,5040	0,7151	7,6818	
30. "	1540	1,013	3,4557	0,3543	7,4382	Biergenuss
31. "	1320	1,016	2,6004	0,3550	6,2370	

Das Verhältniss zwischen reducirenden Substanzen und Kreatinin ist hier also ein in gewissem Sinne entgegengesetztes von dem unter gleichen Bedingungen bei gleichzeitiger Muskelthätigkeit beobachteten. Dort eine durch die Kreatininvermehrung verursachte Steigerung der Menge reducirender Substanzen, hier eine Verminderung des Kreatinins und Vermehrung der Substanzen.

Die übereinstimmenden Resultate der drei Bierexperimente führen sonach zu dem nothwendigen Schlusse: die durch den Biergenuss verursachte Vermehrung der reducirenden Substanzen ist nicht auf eine Veränderung in der Kreatininausscheidung zurückzuführen.

Die Feststellung der vorhin auseinandergesetzten Beziehungen zwischen der Ausscheidung an reducirenden Substanzen und des Kreatinins zwangen mich, auch auf die ent-



gehen, allein hier stuess ich in der Litteratur auf Widerspruche.

Schon Liebig<sup>1)</sup> gibt an, dass die Muskeln wild lebender, gejagter Fische zehnmal mehr Kreatinin enthalten, als die Muskeln fatter in Gefangenschaft lebender Thiere und wenn er auch dieses Missverhalten wesentlich durch den verschiedenen Fettgehalt bedingt hält, so lag doch auch gerade nach seinen Anschauungen, nach welchen der Sauerstoff bei der Kraftleistung mit Vorliebe die leichter brennbaren Fette und Kohlehydrate und erst, wenn diese in ungenügender Menge dargeboten werden, die Eiweissstoffe angreift, so lag es doch darnach nahe, auch der in beiden Fällen wesentlich verschiedenen Muskelthätigkeit einen Einfluss in dieser Richtung einzuräumen.

Thatsächlich zog auch Sarokin<sup>2)</sup> aus seinen Untersuchungen am ruhenden und tetanisirten Froschmuskel den Schluss, dass beim Tetanus die Gesamtmenge von Kreatin und Kreatinin wachse. Diese Angaben wurden aber von Nawrocki<sup>3)</sup> angefochten, nach welchem Autor die Differenzen im Kreatiningehalte im tetanisirten und geruhten Muskel in die Fehlergrenzen der Bestimmung fallen. Hingegen fand die erste Ansicht ihre Bestätigung durch die Untersuchungen von Sezelkow,<sup>4)</sup> der in den angestregten Muskelgruppen desselben Thieres grössere Kreatininmengen fand, als in den weniger activen, ferner nach durch Rückenmarkdurchschneidung hervor-gebrachter Lähmung eine Kreatininabnahme, nach Tetanisirung eine Steigerung des Kreatiningehaltes nachweisen konnte; Angaben, die auf einen ernsten Widerspruch Nawrocki's stiessen.

Diese Gegensätze veranlassten Voit<sup>5)</sup> zu einer Nachprüfung, die als die klassische Arbeit auf diesem Gebiete eingehend zu würdigen ist. Voit untersuchte zunächst den Kreatingehalt des geruhten, tetanisirten und zeitstarren Muskels

---

1) Liebig, *Annalen d. Chemie u. Pharm.*, 1848.

2) *Archiv f. path. Anat.*, 1863.

3) *Centralblatt f. d. med. Wissensch.*, 1866.

4) *Centralblatt f. d. med. Wissensch.*, 1866.

5) *l. c. S. 87—92.*

und findet, dass in den beiden letzteren Fällen eine Kreatinabnahme zu constatiren sei. Hierauf stellt er sich die Frage: Ist diese Kreatinabnahme auf eine Umwandlung desselben in Kreatinin zurückzuführen? Hierüber stellt er beim Frosch einen quantitativen Versuch an, der ergibt, dass die Kreatininmenge in der That im frischen Muskel die kleinste war, dann kam die aus dem tetanisirten und dann die aus dem zeitstarren. Allein diesem Versuche möchte ich doch mit Voit keine volle Beweiskraft zuschreiben, weil, wie Voit angibt, die Kreatininchlorzinkkrystalle nach der Fällung in einen Syrup eingeschlossen waren und ihre quantitative Bestimmung durch einfache Schätzung geschah.

Ein zweiter Versuch ergibt aus dem frischen Fleische 0,0666% Kreatinin, aus dem tetanisirten 0,0162%, aus dem starren keines. Daraus zieht nun Voit den Schluss: «Beim Tetanus geht eine kleine Menge Kreatin in einen anderen Körper über, der nach meinen jetzigen Erfahrungen nicht als Kreatinin zu bezeichnen ist, obwohl es a priori am wahrscheinlichsten wäre. Jedenfalls steht aber fest, dass durch die Arbeit die Summe von Kreatin und Kreatinin nicht grösser wird.»

Dieser Schluss erscheint aber doch nicht einwandfrei; denn da, wie Voit im Folgenden nachweist, Zersetzungen im todten Muskel vor sich gehen, sind die Resultate, die bei dem noch zuckenden Muskel gewonnen wurden, keineswegs auf gleiche Stufe mit jenen zu stellen, bei denen zwischen Tod und Verarbeitung eine mehr oder weniger lange Zeit dazwischen lag. So findet Voit im frischen Rindsmuskel 0,0197 g Kreatinin, im starren davon keine Spur. Da also das im Muskel enthaltene Kreatinin durch Liegen schwindet, darf man aus der Beobachtung, dass kein Kreatinin in einem nicht sofort untersuchten Muskel zu finden ist, in keinem Falle schliessen, dass keines in ihm gewesen; also in unserem Falle, dass Kreatin nicht in Kreatinin übergegangen sei oder Kreatinin gebildet worden wäre; denn es könnte ja Umwandlung oder Bildung thatsächlich stattgefunden haben, das Gebildete aber demselben Loose wie das schon früher im Muskel Enthaltene verfallen sein.

der Muskelthätigkeit eine Kreatininproduktion vor sich gehen, ist durch die vorliegenden Untersuchungen am Muskel nicht gelöst worden. Man sieht sich daher unmittelbar auf die Harnanalyse hingewiesen und ich ging daher, die entsprechenden Untersuchungen am Muskel späterer Zeit vorbehaltend, zunächst daran, von der Beobachtung der Harnausscheidung Aufschlüsse über diesen Punkt zu holen. Aber hier begegnet man denselben Widersprüchen, die früher den Weg verlegten. Auf der einen Seite stehen Voit und Hofmann mit der Behauptung, dass Muskelthätigkeit keine Kreatininvermehrung im Harn bedinge; auf der anderen vertreten neuere Forscher (Grocco, Moitessier) gerade die entgegengesetzte Ansicht.

Um mir daher einen Einblick in die hierbei in Betracht kommenden Verhältnisse zu verschaffen, stellte ich vor Allem eine Reihe daraufhin gerichteter Experimente an.

Durch längere Beobachtung einer sitzenden Lebensweise, energischer Muskelthätigkeit entwöhnt, unternahm ich an einem Nachmittage einen anstrengenden Marsch von 4 Stunden, der nach der folgenden Müdigkeit zu schliessen unter diesen Verhältnissen eine beträchtliche Muskelanstrengung vorstellen musste. Die Versuchsperiode, bei der vollkommen gleichförmige Ernährung beobachtet wurde, ergab folgendes Resultat:

Datum	Harnmenge in ccm.	Spec. Gew.	Kreatin in g	Anmerkung
19. Mai	1164	1,022	0,9951	—
20. „	1056	1,027	1,3067	Muskelbewegung
21. „	878	1,028	1,4569	—
22. „	1078	—	0,9511	—

Wie aus den Zahlen klar ersichtlich ist, erhebt sich die Kreatininausscheidung an dem Tage, an welchem die beschriebene Muskelarbeit erfolgte, gegenüber der Kreatininausscheidung am vorhergehenden Tage, die nach meinen Erfahrungen ungefähr dem Normalwerth des von mir täglich

ausgeschiedenen Kreatinins entspricht, um ein Beträchtliches (0,3116 g), erhält sich noch am folgenden Tage auf gleicher Höhe oder zeigt vielmehr noch eine kleine Steigerung und erreicht am dritten wieder ihren gewöhnlichen Werth. Die andauernde Steigerung der Kreatininmenge hat durchaus nichts Befremdendes an sich; denn die Muskelleistung geschah bis 7 Uhr Abends und die in der Rubrik 20. Mai angeführte Harnausscheidung enthielt nur noch die Nachtausscheidung desselben Tages. Ja es erschiene im Gegentheil sonderbar, wenn die Kreatininmenge ein nur plötzliches Anwachsen zeigte, während die Müdigkeitsempfindung einen längeren Process anzeigt. Wenn die Kreatininausscheidung als Ausdruck einer die gesteigerte Assimilation begleitenden Dissimilation aufgefasst wird, erscheint ein derartiges Verhalten mit unseren sonstigen physiologischen Vorstellungen vollständig vereinbar. Auch gibt uns die normaliter bis 60 Stunden dauernde Methylenblauausscheidung ein bekanntes Beispiel protrahirter Elimination. Uebrigens hatte ich bereits selbst einmal Gelegenheit,<sup>1)</sup> auf ein analoges Verhalten auch in der Ausscheidung der reducirenden Substanzen hinzuweisen.

Einen zweiten Versuch verdanke ich der Güte Herrn Professors Malfatti. Er unternahm eine anstrengende 14 Stunden dauernde Radfahrt, wobei fast nur Kohlehydrate als Nahrung aufgenommen wurden. Ebenso wurde am folgenden Tage (6. Juni) fast rein vegetabilische Kost genossen. Die Harnuntersuchung ergab:

Datum	Harnmenge	Spec. Gew.	Kreatinin
5. Juni 8 Uhr früh — 8 Uhr Ab.	576	—	0,6787
5. Juni 8 Uhr Ab. — 6. Juni 8 Uhr früh	575	1030	0,6570
6. Juni 8 Uhr früh — 8 Uhr Ab.	350	1030	0,2522
6. Juni 8 Uhr Ab. — 7. Juni 8 Uhr früh	565	1026	0,3167
7. Juni 8 Uhr früh — 8 Uhr Ab.	610	1024	0,3057

1) Wiener klin. Wochenschr., 1900, Nr. 16.

Harn eine bedeutende Kreatininvermehrung. Die Steigerung ist hier stärker als im ersten Versuche, weil einerseits die Muskelaction in den Anfang der die Steigerung enthaltenden Beobachtungsperiode fiel, andererseits wegen des muskulöseren Baues der zweiten Versuchsperson die Muskelleistung eine geringe Veränderung des normalen Stoffwechsels bedingen mochte.

Um aber den Einfluss einer auch nur mässigen Fleischnahrung zu beseitigen, leitete ich einen ähnlichen Versuch durch den längere Zeit dauernden Genuss einer vollständig fleischlosen möglichst stickstoffarmen Kost ein, und als mir die gegenüber der für mich geltenden Norm erhaltenen Stickstoff- und Kreatininwerthe auch nicht die leiseste Spur einer Nachwirkung der reichlicheren Ernährungsform vermuthen liessen, unternahm ich am Morgen des Beobachtungstages eine 3 stündige (5—8 Uhr früh) anstrengende Radpartie und ermüdete darauf die übrige Muskulatur durch Turnen.

Zum Resultate erhielt ich:

Datum	Harnmenge	Kreatinin	Gesammt-N	Anmerkungen
30. Juli	1540	0,3543	7,4382	—
31. „	1320	0,3550	6,2370	—
1. August	960	0,6329	6,4176	Muskelaction
2. „	1348	0,3572	6,3625	—

Die Stickstoffcarenz hat also einen Abfall der Kreatininausscheidung auf fast den dritten Theil des gewöhnlichen Werthes zur Folge. Die Muskelthätigkeit ruft eine Steigerung fast auf das Doppelte hervor. Auch hier ist die Kreatininschwankung eine schärfere als im ersten Versuche, was schon durch die Versuchsanlagen bedingt wurde und auch mit den beobachteten Ermüdungserscheinungen im Einklange steht, die in Folge vorhergegangener Gewöhnung an Muskelthätigkeit jetzt rasch abliefen.

Durch die in den beschriebenen Experimenten gewonnenen Erfahrungen war mir der Schlüssel zum Verständnisse

der von den Autoren angeführten Resultate gegeben und an ihrer Hand soll nun eine Durchsicht der vorliegenden Angaben geschehen.

Wenn Voit den Satz aufstellt:<sup>1)</sup> « Anstrengende Körperbewegung bringt keine wesentliche Aenderung in der Kreatinin-ausscheidung hervor, » so stützt er sich hierbei auf zwei an Hunden in der Inanition ausgeführte Versuche. Der erste brachte folgendes Ergebniss:

D a t u m	N a h r u n g		Harn- menge	Harn- stoff	Kreati- nin	Kreatin	Koth	Fleisch- umsatz
	fest	Wasser						
8. Juli 1865	—	243	183	15,3	0,570	—	—	209
9. „ „	—	320	133	11,6	0,632	—	—	159
10. „ „	—	367	140	11,6	0,418	—	—	159
11. „ „	—	1000	137	11,2	0,574	—	—	153
12. „ „	—	500	150	12,5	0,854	0,0211	—	171
13. „ „	—	440	141	11,8	1,053	0,0493	—	162

Am 11. Juli, heisst es, musste der Versuchshund 8 Stunden laufen. Hält man sich freilich an das Resultat desselben Tages, dann ist allerdings keine wesentliche Kreatininveränderung wahrnehmbar. Aber wir sahen vorhin, dass die Wirkung unter Umständen auf die folgenden Perioden fallen könne, und thatsächlich sind diese hier auf fast das Doppelte der Vorperiode erhöht. Der zweite Versuch, unter gleichen Bedingungen angestellt, zeigt am Tage der Muskelthätigkeit einen abnorm geringen Kreatininwerth, am folgenden eine Steigerung desselben; leider bricht der Versuch schon hier ab, so dass es unbestimmt bleibt, ob diese Steigerung eine ebenso gewaltige Kreatininvermehrung einleiten sollte wie im ersten Falle oder der dritte Tag einen Rückgang zur Norm brachte.

An der Seite Voit's steht Hofmann,<sup>2)</sup> dessen Tabelle, aus der entnommen werden soll, dass Muskelthätigkeit keine Kreatininvermehrung im Gefolge habe, lautet:

<sup>1)</sup> l. c. S. 100.

<sup>2)</sup> Virchow's Archiv, Bd. 48, 1869.

Datum	Bewegung	Harnmenge	Spec. Gewicht	Kreatinin in 24 Std.
December				
15.—20.	Bewegung	860	1,025	0,734
20.—21.	Ruhe	1160	1,025	0,612
21.—22.	Bewegung	875	1,028	0,620
22.—23.	Ruhe	1050	1,026	0,711
23.—24.	Bewegung	970	1,030	0,731

Ich wüsste wirklich nicht, wie diese Zahlen anders zu deuten wären, als: der erste Bewegungstag zeigt gegenüber dem folgenden Ruhetage eine Steigerung der Kreatininmenge, der nächste Bewegungstag keine wesentliche Veränderung gegenüber der Ruhe, wohl aber der ihm folgende Ruhetag eine lebhafte Steigerung, die unter dem Einflusse der folgenden Bewegung erhalten bleibt.

Datum	Bewegung	Harnmenge	Spec. Gewicht	Kreatinin in 24 Std.
December				
28.—29.	Ruhe	1005	1,028	0,665
29.—30.	Bewegung	1025	1,028	0,687
30.—31.	Ruhe	1140	1,024	0,719

Hier müsste die Erklärung lauten: an dem dem Bewegungstage folgenden Ruhetage macht sich eine Steigerung geltend:

Datum	Bewegung	Harnmenge	Spec. Gewicht	Kreatinin
Januar				
4.—5.	Bewegung	940	1029	0,613
5.—6.	Ruhe	1215	1022	0,744
6.—7.	Ruhe	1150	1024	0,592
7.—8.	Bewegung	1100	1030	0,811
8.—9.	Ruhe	1095	1025	0,605

Auf die Bewegung folgt eine starke Kreatininvermehrung am nächsten Ruhetage; der darauf folgende Ruhetag zeigt einen subnormalen Werth, der am folgenden Bewegungstage in eine lebhafte Steigerung umschlägt, um dann wieder normal zu werden.

Wie klar ersichtlich, ist in allen Fällen die Muskelaction von einer stärkeren Kreatininausscheidung gefolgt. Freilich kommt die Wirkung nicht immer deutlich zum Ausdruck, da die Versuchsanordnung unzweckmässig erscheint, so dass die Resultate wohl zur Bestätigung einer bekannten, aber unmöglich zur Ableitung einer neuen Thatsache dienen konnten.

Da somit die meinen Befunden scheinbar widersprechenden Angaben weit entfernt, mit der hier vertretenen Ansicht im Widerspruche zu stehen, sogar direkte Beweise für sie bieten, so dürfen wir im Einklange mit den Forschungen von Grocco<sup>1)</sup> und Moitessier<sup>2)</sup> die Behauptung aufstellen: die Muskelthätigkeit verursacht eine Vermehrung der Kreatininausscheidung, die unter verschiedenen Verhältnissen in verschiedenen Ausscheidungsperioden zur Geltung kommt.

Und diese Thatsache erscheint mir von fundamentaler Bedeutung, weil sie zu einem tieferen Verständniss der Physiologie des Kreatinins hinleitet, als es durch die sonst geläufige Anschauung, Kreatinin sei eine Vorstufe des Harnstoffs, gegeben ist; denn fragen wir nach den Gründen<sup>3)</sup> derselben, so finden wir bloss auf die chemische Verwandtschaft beider Körper hingewiesen, wodurch diese Auffassung mehr als ein Wunsch, die fehlenden Vorstufen des Harnstoffs zu ermitteln, charakterisirt ist. Ueberhaupt hatte diese Theorie auch nur so lange Existenzberechtigung, als der Nachweis noch ausstand, dass Kreatinin ein Stoffwechsel-Endprodukt sei. Dieser Nachweis war natürlich durch die Erfahrung, dass per os eingenommenes Kreatinin unverändert abgeschieden wird, nicht gegeben, da, wie Bunge bemerkt,<sup>4)</sup> es gar nicht in unserer Macht liegt, künstlich eingeführte Stoffe dorthin gelangen zu lassen, wo sie in der Norm zersetzt würden, ist aber einwandfrei durch die

---

1) *Annali di chimico o di formacia*, IV, 211, 1886.

2) *Moritetsier*, *Infl. du travail muscul. sur l'élim. de la créat.*  
C. R. Soc. Prol. 1891.

3) Vgl. Bunge, *Lehrb. der physiol. u. pathol. Chem.*, S. 322, 1898.

4) *l. c.* S. 322.



Beobachtung erbracht, dass in der Inanition die gleiche Menge Kreatinin im Harne erscheint, als in der durch die Stickstoffberechnung ermittelten zersetzten Muskelsubstanz enthalten ist.<sup>1)</sup>

Aber ebensowenig wie das Kreatinin als ein mangelhaft oxydirtes Zerfallsprodukt des Eiweisses anzusehen ist, darf es als ein Zerfallsprodukt des Eiweisses überhaupt hingestellt werden; denn es wäre in der That nicht einzusehen, warum unter der im Muskel zersetzten Eiweissmenge ein Theil constant eine besondere Umwandlung erfahre. Weit mehr unserem physiologischen Denken entsprechend erscheint dagegen die Hypothese, das Kreatinin sei ein Produkt eines specifischen Muskelstoffwechsels, ein Ausdruck für die die Thätigkeit dieses Organes begleitende Dissimilation seiner Bestandtheile.

Für die Berechtigung der aufgestellten Hypothese spricht ferner der Umstand, dass unsere Erfahrungen bezüglich der Kreatininausscheidung durch sie eine zwanglose Deutung erfahren, so die Thatsache, dass die Kreatininausscheidung sich in gewisser Hinsicht unabhängig von der Nahrungsaufnahme erweist, indem selbst bei stickstoffarmer oder kreatininfreier Nahrung Kreatinin im Harne erscheint und sich nach Grocco selbst im Harne ausschliesslich durch Milch ernährter Säuglinge nachweisen lässt, ferner die Beobachtung, dass bei vermindertem Muskelquantum nach Muskelatrophie selbst bei guter Ernährung eine Kreatininabnahme erfolgt,<sup>2)</sup> und die Wahrnehmung Hofmann's, dass febrile Consumption eine Steigerung der Kreatininmenge im Harne bedingt.

Sollte sich die hier skizzirte Ansicht bestätigen, so würde die Kreatininausscheidung in dieselbe Reihe zu stellen sein, wie die Ausscheidung der Harnsäure und der Purinkörper, welche ja heute allgemein als die Produkte eines besonderen, neben dem gewöhnlichen Eiweissstoffwechsel einhergehenden Zellkernstoffwechsels angesehen werden.

---

<sup>1)</sup> Vgl. Noorden, *Pathol. des Stoffwechsels*, 93, S. 169.

<sup>2)</sup> Langer, *Progress. Muskelatrophie mit paralyt. Lendenlordose*. Deutsch. Archiv f. klin. Med., 32, 1883.

---

# **Ein einfaches Verfahren zur Ueberführung der Amidofettsäuren in die entsprechenden Monochlorfettsäuren.**

Von  
Apoth. **Emil Jochem.**

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 39.)

(Der Redaction zugegangen am 28. September 1900.)

---

Bei auf Anregung von Herrn Professor Hofmeister angestellten Versuchen aus den Spaltungsprodukten des Eiweisses, wie sie beim Zerkochen von Eieralbumin mit Salzsäure erhalten werden, durch Einwirkung von salpetriger Säure zu den zugehörigen Oxyssäuren zu gelangen, erhielt ich vorwiegend gechlorte Verbindungen. Die ausgeätherten Reaktionsprodukte hinterliessen nach dem Abdestilliren des Aethers einen Syrup, aus dem nach zweitägigem Stehen schöne, derbe Krystalle anschossen, die Chlor enthielten. Die Elementaranalyse ergab die für Chlorbernsteinsäure verlangten Zahlen.

Da Asparaginsäure ein constantes, wenn auch meistens nur in geringer Menge auftretendes Spaltungsprodukt der Eiweisskörper darstellt, lag die Vermuthung nahe, dass die gefundene Chlorbernsteinsäure von dieser abstamme, was mich veranlasste, zu untersuchen, wie sich unter den gewählten Reaktionsbedingungen die Asparaginsäure verhalten möge. Auch in diesem Falle erhielt ich dieselbe Säure.

Es wurde nun mit wechselnden Mengen von Salzsäure und Nitrit der Versuch angestellt, aus verschiedenen Aminosäuren und Basen zu chlorirten Produkten zu gelangen. Die beste Ausbeute erhielt ich beim Lösen bezw. Suspendiren der Aminosäuren in der zehnfachen Menge concentrirter Salzsäure und tropfenweisem Zufügen von molekularen Mengen Natriumnitrit

die Aminosäuren der Essig- und Oxalsäurereihe, ferner für die Aminosäuren der aromatischen Reihe mit dem Sitze des  $\text{NH}_2$  in der Seitenkette. Abnorm verlief die Reaction beim Tyrosin, wo anscheinend neben der Chlorirung ein Ersatz der Hydroxylgruppe durch eine  $\text{NO}_2$ -Gruppe vor sich geht. Die aromatischen Aminosäuren mit  $\text{NH}_2$  im Kerne, sowohl wie die aromatischen und aliphatischen Basen lassen sich nicht nach demselben Schema in chlorirte Produkte überführen, wenigstens gelang es mir nicht, solche zu erhalten.

Diese Befunde schliessen sich den Beobachtungen von Curtius<sup>1)</sup> und von Tilden<sup>2)</sup> an, nur dass sich bei dem von mir angewandten Verfahren die gechlorten Produkte unter besonders leicht herstellbaren Bedingungen erhalten lassen.

Curtius brachte aus  $\alpha$ -Aminofettsäuren dargestellte Diazofettsäureester mit concentrirter Salzsäure in Contact und bemerkte, dass sämmtlicher Stickstoff entwich und ein  $\alpha$ -halogen-substituirtes Produkt zurückblieb.

Direkten Ersatz der Aminogruppen durch Chlor glaubte Tilden durch Einwirkung von Nitrosylchlorid auf Amine erzielen zu können. Er erhielt aus Glycocoll Monochloressigsäure und aus Asparagin Chlorbernsteinsäure. Man darf wohl die Einwirkung von Nitrosylchlorid, die sich in erwähntem Sinne erst bei höherer Temperatur geltend macht, jener des Gemenges von salpetriger Säure und Salzsäure gleichstellen und somit auf die Reaction von Curtius zurückführen.

Vor dem Verfahren von Curtius hat mein Vorgehen voraus, dass es die Darstellung des Aminosäureesters umgeht und ohne vorgängige Isolirung der Diazoverbindungen zum Ziele führt. Von besonderem Nutzen dürfte diese Art der Gewinnung von chlorirten Säuren sein in den allerdings seltenen Fällen, wo die Aminosäuren leichter zu beschaffen sind als die entsprechenden freien Säuren, so beim Leucin und der Glutamin-

---

<sup>1)</sup> Curtius, B. B. Bd. 16, S. 754, 1883.

<sup>2)</sup> Tilden, Journ. chem. Soc., 1895, I, 489 B. B. Bd. 28, Ref. S. 646, 1895; Ch. Cbl., 1895, II., 30.

säure, eventuell auch für die Darstellung der activen Modificationen von gechlorten Säuren aus den in der Natur vorkommenden activen Aminosäuren. Da die Reaction schon bei Zimmertemperatur vor sich geht, dürften einheitliche, optisch active Produkte entstehen.

Ein unter Umständen werthvoller Vorzug dieses Verfahrens von Chloreinführung anderen Methoden der Chlorirung gegenüber liegt darin, dass unter den von mir eingehaltenen Bedingungen der Eintritt des Chlors auf den Ort der  $\text{NH}_2$ -Gruppe beschränkt bleibt. Auch für den qualitativen Nachweis von Aminofettsäuren kann die Reaction dienstbar gemacht werden. Man löst oder suspendirt die betreffende Substanz in der zehnfachen Menge concentrirter Salzsäure, behandelt mit Natriumnitritlösung, wobei das gechlorte, mit Aether extrahirbare Produkt entsteht. Der Verdunstungsrückstand des Aethers wird mit Salpetersäure angesäuert und mit Silbernitratlösung im Ueberschuss versetzt, wobei anhaftende Salzsäure niedergeschlagen wird. Das Filtrat liefert mit concentrirter Salpetersäure gekocht von Neuem einen reichlichen Chlorsilberniederschlag. Die Entstehung von chlosubstituirt Fettsäuren vom Glycocoll aufwärts macht sich überdies schon durch das Auftreten öligler Tropfen bemerkbar.

Für die physiologische Chemie dürfte die Reactionsfähigkeit der Aminosäuren nach dieser Richtung hin insofern von Interesse sein, als man damit Aufschluss über die das Eiweissmolekül bildenden Mono- und Diaminosäuren in anderer als bisher eingeschlagener Richtung erhalten kann. Herr Professor Hofmeister hat für die Weiterführung der Untersuchungen unter Zugrundelegung dieser Erfahrungen bereits Sorge getragen.

Im Nachstehenden theile ich einige einschlägige Versuche mit, welche über die Anwendbarkeit des Verfahrens zur Darstellung bekannter und Auffindung neuer Chlorfettsäuren ein Urtheil ermöglichen.

#### **Darstellung von Chlorbernsteinsäure aus Eialbumin.**

Ich kochte Eiereiweiss mit der dreifachen Menge concentrirter Salzsäure auf dem Sandbade während fünf Stunden

schwarzbraune Lösung von ausgeschiedenen schwarzen Produkten, «Melaninen», ab und liess unter Umrühren und Kühlen mit Wasser eine gesättigte wässrige Lösung von Natriumnitrit aus einer Pipette zufließen. Die Aminosäuren mögen hier in etwa 20%iger Salzsäure gelöst gewesen sein. Die angewandte Menge salpetrigsaures Natrium betrug 80 g auf 100 g Eiweiss, 10% mehr als die auf 15% Stickstoff berechnete Menge. Nachdem etwa die Hälfte der Natriumnitritlösung verbraucht war, nahm die Flüssigkeit eine hellgelbe Färbung an und trübte sich unter Ausscheidung öligler Tropfen, die sich auf dem Boden des Gefässes ansammelten. Auf der Oberfläche schwamm eine schwarze harzige Masse, die entfernt wurde. Es trat reichliche Entwicklung von Stickstoff und Kohlensäure auf. Die zweite Hälfte der Natriumnitritlösung wurde ebenfalls vorsichtig zugefügt und das Gemisch alsdann eine Zeit lang sich selbst überlassen. Um die überschüssige salpetrige Säure und das Stickoxyd zu vertreiben, leitete ich eine Stunde lang Luft durch das Gemenge und trennte die beiden Schichten im Scheidetrichter. Die hellgelbe wässrige Lösung wurde durch Schütteln mit Aether erschöpft und die ätherische Lösung auf einem mässig erwärmten Wasserbade abdestillirt. Aus dem syrupösen Rückstand krystallisirte ein Körper aus, der von der Mutterlauge abgesaugt, mit wenig Aether nachgewaschen und durch Umkrystallisiren aus letzterem Lösungsmittel gereinigt wurde. Die Krystalle zeigten den Schmelzpunkt 174°.

Die im Vacuum-Éxsiccator getrocknete Säure ergab folgende Werthe:

	Berechnet für $C_4H_5ClO_4$ :	Gefunden:	
		I.	II.
C	31,48%	31,61%	31,71%
H	3,27%	3,45%	3,39%
Cl <sup>1)</sup>	23,25%	23,02%	23,13%

Es lag sonach eine Monochlorbernsteinsäure vor, welche

---

1) Obige Chlorbestimmungen sowohl als die folgenden wurden nach Carius ausgeführt, die Verbrennungen durch Mischen der Substanzen mit Bleichromat.

ihrem Schmelzpunkte nach mit einer der activen Modificationen, vermuthlich mit der von Tilden und Marshall aus Asparagin durch Nitrosylchlorid neben Fumarsäure erhaltenen l-Chlorbernsteinsäure identisch ist.

#### Darstellung von Monochloressigsäure auf Glycocoll.

5 g käufliches Glycocoll wurden mit der zehnfachen Menge concentrirter Salzsäure angerieben und unter Kühlen mit einer gesättigten Natriumnitritlösung, enthaltend 5 g salpetrigsaures Natrium, tropfenweise versetzt; dann überliess ich das Gemisch einige Zeit sich selbst, leitete Luft durch und ätherte aus. Der ätherische Rückstand krystallisirte im Exsiccator aus und wog 2,3 g. Da Monochloressigsäure in Wasser leichter löslich ist als in Aether, kann durch Ausäthern nicht festgestellt werden, ob die Reaction quantitativ verläuft, doch kann man mit Sicherheit annehmen, dass 40% des angewendeten Glycocolls als gechlorte Säure erhalten werden.

Die durch Destillation rein erhaltenen Krystalle schmolzen bei 62°.

Berechnet für  $C_2H_3ClO_2$ :

Gefunden:

	I.	II.
Cl 33,48 %.	33,59 %	33,53 %

#### Darstellung von Phenylchloroessigsäure aus Phenylaminoessigsäure.

Die Aminosäure wurde nach der Methode von Tiemann <sup>1)</sup> dargestellt. 10 g des Präparates wurden genau wie bei den vorhergehenden Aminosäuren in salzsaurer Lösung mit 5,5 g Natriumnitrit behandelt, das Reactionsprodukt ausgeäthert und der Destillationsrückstand, ein gelber Syrup, zur Krystallisation in den Exsiccator gestellt. Die Ausbeute an Rohprodukt betrug 8,3 g, war also nahezu quantitativ. Durch Umkrystallisiren aus heissem Ligroin erhielt ich die bei 78° schmelzende gechlorte Säure.

Berechnet für  $C_8H_7ClO_2$ :

Gefunden:

	I.	II.
Cl 20,79 %.	20,67 %	20,93 %

<sup>1)</sup> Tiemann, B. B. Bd. 13, S. 383, 1880.

Die Glutaminsäure gewann ich aus käuflichem Casein durch Kochen mit der dreifachen Menge concentrirter Salzsäure während 5 Stunden am Steigrohre. Der Zerkochungsflüssigkeit setzte ich nach vorausgegangener Verdünnung mit Wasser auf je 100 Theile Casein 10 Theile Phosphorwolframsäure in Lösung zu und liess im Eiskasten absitzen. Von dem schlammigen Niederschlage und aufschwimmenden Fette wurde abfiltrirt, das Filtrat zur Syrupdicke eingeeengt, mit Salzsäuregas gesättigt und das Gemisch über zuletzt genannter Säure unter einer Glasglocke an einem kühlen Orte aufgestellt. Schon nach einigen Stunden schieden sich aus der hellbraunen Lösung glänzende Krystalle aus; nach achttägigem Stehen war der Inhalt des Glases zu einer salbenartigen Masse erstarrt. Der Krystallbrei wurde an einer guten Saugpumpe während 10 Stunden abgesaugt, die Krystalle auf poröse Thonplatten aufgestrichen, welche die noch anhaftende Mutterlauge rasch aufsaugten, sodass auf dem Thone eine verfilzte, fast völlig weisse Kruste zurückblieb. Letztere wurde abgekratzt, in wenig Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt und aus der farblosen Lösung die Glutaminsäure als salzsaures Salz durch Einleiten von gasförmiger Salzsäure ausgeschieden. 2 Kilo des noch stark verunreinigten technischen Caseins lieferten auf diese Weise behandelt 320 g reine salzsaure Glutaminsäure, die ich in Portionen zu 100 g auf  $\alpha$ -Chlorglutarsäure verarbeitete.

Auf 100 Theile salzsaure Glutaminsäure verwandte ich 45 Theile Natriumnitrit und verfuhr genau wie vorher bei der Darstellung der gechlorten Produkte, nur wurde der ätherische Auszug diesmal nicht durch Destillation auf dem Wasserbade eingeeengt, weil man sonst Gefahr läuft, dass sich die neue Säure zersetzt. Das Verjagen des Aethers geschah im Vacuum bei einer Temperatur, die  $30^{\circ}$  nicht überschritt. Der Rückstand, ein gelber Syrup, wurde in eine flache Krystallisirschaale gebracht, durch Evacuiren im Exsiccator von dem noch anhaftenden Aether befreit, wobei sich die gechlorte Säure mikrokrySTALLINISCH ausschied. Beim Aufstreichen auf Thonplatten

verschwand die anhaftende Mutterlauge, und ein weisser Krystall-überzug blieb zurück. Nach öfterem Umkrystallisiren aus wasserfreiem Aether erhielt ich durch Ueberschichten der ätherischen Lösung mit Ligroin bis zur beginnenden Trübung grosse, einen Centimeter lange, pyramidenartige Gebilde, die aus lauter kleinen Krystallen aufgebaut waren. Die einzelnen Kryställchen waren jedoch zu klein, um einer Messung unterzogen werden zu können. Die Ausbeute überstieg nicht 20% der verarbeiteten salzsauren Glutaminsäure; ein Theil davon scheint durch Oxydation verloren zu gehen, denn es tritt neben Stickstoff auch reichliche Kohlensäureentwicklung auf.

Die Krystalle sinterten bei 97° und waren bei 100° ganz geschmolzen. Die  $\alpha$ -Chlorglutarsäure löst sich sehr leicht in Wasser, Alkohol, Aether und Aceton, ist unlöslich in Benzol, Chloroform und Ligroin. Mit Wasser zersetzt sie sich aber leicht unter Abgabe ihres Chlors, das als Salzsäure in der Flüssigkeit gefunden wird; ebenso leicht zersetzlich sind die Salze in wässriger Lösung. Die Analyse der bei 35° getrockneten Substanz gab die für Monochlorglutarsäure erwarteten Werthe:

Berechnet für  $C_5H_7ClO_4$ :

Gefunden:

		I.	II.
C	36,05 %	36,24 %	36,16 %
H	4,20 %	4,30 %	4,29 %
Cl	21,30 %	21,42 %	21,38 %

#### Baryumsalz.

Etwa 2 g reiner Säure wurden in 20 g absolutem Methylalkohol gelöst und mit einer methylalkoholischen Barytlösung neutralisirt. Es schied sich sofort das Baryumsalz als weisser, voluminöser Niederschlag aus, der nach dem Auswaschen mit Methylalkohol und Trocknen bei 35° zur Baryum- und Chlorbestimmung diente. Das Salz ist in Wasser leicht löslich, aber nicht ohne Chlorabspaltung, und fällt auf Zusatz von Alkohol wieder aus:

Berechnet für  $C_5H_6ClO_4Ba$ :

Gefunden:

		I.	II.
Cl	11,75 %	11,55 %	11,69 %
Ba	45,52 %	45,49 %	45,45 %



3,4 g reine Säure wurden in absolutem Methylalkohol gelöst, mit methylalkoholischem Ammoniak genau neutralisirt und mit einer Lösung von Kupferchlorid in genanntem Lösungsmittel ausgefällt. Der hellblaue Niederschlag wurde ausgewaschen und getrocknet. Die Versuche, sowohl das Kupfersalz als das Baryumsalz aus Wasser umzukrystallisiren, scheiterten an der leichten Zersetzlichkeit der Chlorglutar säure.

#### Analyse:

Berechnet für  $C_6H_5ClO_4$  Cu:

Gefunden:

	I.	II.
Cl 15,55 %	15,53 %	15,37 %
Cu 27,99 %	27,83 %	27,91 %.

#### $\alpha$ -Chlorglutar säure-Diäthylester.

5 g reiner Säure wurden in absolutem Aethylalkohol, der zuvor mit Salzsäuregas bei 0° gesättigt war, gelöst, die Lösung während 3 Tagen im Eisschranke sich selbst überlassen, alsdann in Wasser gegossen, der Ester im Scheidetrichter abgetrennt und mit Natriumcarbonatlösung geschüttelt, bis die saure Reaction verschwunden war. Das anhaftende Natriumcarbonat lässt sich durch Ausschütteln mit Wasser, dem gegenüber der Ester weit beständiger ist als die Säure und ihre Salze, leicht auswaschen. Ich trocknete den Ester in ätherischer Lösung über Chlorcalcium und destillirte im Vacuum.

$\alpha$ -Chlorglutar säure-Diäthylester ist schwerer als Wasser, hat das specifische Gewicht 1,14 bei 23°, siedet im Vacuum (15 mm. Druck) bei 140—145°, bei gewöhnlichem Druck nicht unzersetzt etwa bei 245° (i. D.) und besitzt angenehmen Geruch.

Berechnet für  $C_8H_{15}ClO_4$ :

Gefunden:

	I.	II.
C 48,56 %	48,64 %	48,47 %
H 6,75 %	6,82 %	6,85 %
Cl 15,94 %	15,76 %	16,09 %.

#### Ueberführen der $\alpha$ -Chlorglutar säure in die entsprechende Oxy säure.

Wie bereits erwähnt, zersetzt sich die  $\alpha$ -Chlorglutar säure leicht in Wasser, indem sie Chlor als Salzsäure abgibt; das

entstehende Produkt musste also eine Oxysäure sein. Ich stellte eine 5%ige wässrige Lösung der Säure dar und liess dieselbe 2 Tage in einem Digestorium bei 40—50° stehen, neutralisirte alsdann mit Natronlauge und dampfte auf ein kleines Volumen ein. Die mit Schwefelsäure angesäuerte Lösung wurde ausgeäthert und der Auszug auf dem Wasserbade abdestillirt. Der syrupöse Rückstand erstarrte über Schwefelsäure aufbewahrt zu einer krystallinischen Masse vom Schmelzpunkte 72°.

Um mich zu vergewissern, dass die Säure auch die verlangte  $\alpha$ -Oxysäure war, stellte ich das charakteristische Zinksalz dar. Die Krystallmasse wurde in wässriger Lösung mit Zinkcarbonat erwärmt, das überschüssige kohlen saure Zink mit Wasser wiederholt ausgekocht und die vereinigten Filtrate eingedampft. Der hinterbliebene Syrup krystallisirte zum Theil über Nacht aus. Die Krystalle liessen sich mit wenig Wasser von der anhaftenden dickflüssigen Mutterlauge befreien. Tags darauf zeigte das Waschwasser eine reichliche Ausscheidung von Krystallen, welche abgesaugt und mit der ersten Portion zusammen durch Umkrystallisiren gereinigt wurden. Beim Lösen bedurfte es aber einer grösseren Menge Wassers als zuvor; schon beim Eindampfen schieden sich warzenförmige Krystalle aus, die nach dem Erkalten der Lösung sich noch vermehrten und mikroskopisch untersucht aus lauter kleinen Tafeln bestanden.

Die Zinkbestimmungen in dem bei 125° getrockneten Salze ergaben:

Berechnet für  $\text{ZnC}_6\text{H}_9\text{O}_6$ :

Gefunden:

	I.	II.
Zn 30,94%	30,86%	31,09%

Es unterliegt also keinem Zweifel mehr, dass das aus Glutaminsäure erhaltene gechlorte Produkt die zugehörige  $\alpha$ -Chlorglutarsäure ist.

#### Darstellung von $\alpha$ -Chlorisobutyllessigsäure aus Leucin.

Das verarbeitete Leucin wurde zum grössten Theile erhalten durch 24stündiges Kochen von Hornspänen mit

25%iger Schwefelsäure.<sup>1)</sup> Die Zersetzungsflüssigkeit wurde mit gelöschtem Kalk vom grössten Theile der Schwefelsäure befreit und eingedampft. Die durch Stehenlassen aus der gelben Flüssigkeit erhaltenen Krystallmassen gaben in wässriger Lösung mit Thierkohle gekocht ein farbloses Filtrat, das in der Siedehitze mit Kupfercarbonat behandelt, einen Niederschlag von Leucinkupfer bildete, welcher nach dem Auswaschen mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Das erhaltene Leucin krystallisirte ich aus ammoniakalischem Alkohol um und erhielt auf diese Weise ein von Tyrosin freies Präparat. Es gab wenigstens keine Millon'sche Reaction mehr.

Die Ausbeute an Leucin war eine sehr unbefriedigende, was daher rührt, dass Leucinkupfer bei Anwesenheit von Kupfersalzen anderer Aminosäuren weit löslicher ist als in reinem Zustande. Aus dem Kupferniederschlage erhielt ich auf diese Weise aus 3 Kilo Hornspänen nicht mehr als 50 g Leucin.

Ich verarbeitete dasselbe in Portionen von 25 g wie das Glycocoll. Man muss auch hier mit Wasser kühlen, damit die Temperatur nicht über Zimmerwärme steigt. Als die Hälfte der Natriumnitritlösung verbraucht war, trübte sich das Gemisch durch ausgeschiedene ölige Tropfen, die sich an der Oberfläche sammelten. Durch Ausäthern gewann ich diese ölige Schicht und destillirte bei einer 30° nicht übersteigenden Temperatur den Aether im Vacuum ab. Die neue Säure blieb als ölige, mit Wasser nicht mischbare Flüssigkeit zurück.

Aus den Salzen des so erhaltenen Rohproduktes die reine Säure zu erhalten ist, ihrer leichten Zersetzlichkeit wegen, nicht möglich; auch durch Verseifen des Esters kann die freie Säure nicht erhalten werden, ohne dass gleichzeitig alles Chlor eliminiert wird. Um die anhaftende Salzsäure und salpetrige Säure einigermaassen zu entfernen, sowie beigemengten gelben Syrup zu beseitigen, schüttelte ich in ätherischer Lösung zweimal mit schwach alkalischem Wasser

---

<sup>1)</sup> Hammarsten, Lehrbuch der physiolog. Chemie S. 269.

durch. Die ätherische Schicht wurde durch ein zuvor mit Aether benetztes Filter abfiltrirt, mit Chlorcalcium getrocknet und der Aether im Vacuum vertrieben. Der Rückstand war bedeutend weniger gelb gefärbt. Nach zweitägigem Stehen im Exsiccator über Aetzkali benützte ich einen Theil davon zur Chlorbestimmung.

Da keine Salze ohne Abspaltung von Chlor zu erlangen waren, stellte ich aus dem Reste den Aethylester dar. Die Ausbeute an gechlorter Säure überstieg nicht 20% des angewendeten Leucins.

Die erhaltene Säure stellt eine ölige, schwach gelbe Flüssigkeit dar, welche specifisch schwerer als Wasser und damit nicht mischbar ist. Mit Alkohol und Aether mischte sie sich in jedem Verhältnisse. Selbst beim Einstellen in eine Kältemischung zeigt sie keine Spur von Krystallisation. Sie gibt schon bei 40° Salzsäure ab und lässt sich weder im Vacuum noch bei gewöhnlichem Druck destilliren.

Bei der Chlorbestimmung fand ich:

I.	II.	III.	
23,75%	23,93%	23,80%	Berechnet für $C_6H_{11}ClO_2$ , 23,56%.

#### Aethylester der $\alpha$ -Chlorisobutylelessigsäure.

8 Gramm des auf obige Art von Salzsäure und salpetriger Säure befreiten Chlorproduktes wurden in die zehnfache Menge von bei 0° mit Salzsäuregas gesättigtem, absolutem Aethylalkohol eingetragen und 3 Tage lang im Eisschranke stehen gelassen. Dann wurde in Eiswasser gegossen, der ausgeschiedene Ester im Scheidetrichter abgetrennt und die ihm anhaftende Säure durch Natriumcarbonatlösung beseitigt. Nach dem Trocknen mit Chlorcalcium in ätherischer Lösung destillirte ich im Vacuum bei 15 mm. Druck über, wobei der Ester zwischen 91—95° übergang.

Der  $\alpha$ -Chlorisobutylelessigsäure-Aethylester stellt eine farblose, angenehm nach Ananas riechende, mit Wasser nicht mischbare Flüssigkeit dar vom specifischen Gewicht 1,01 bei 23°. Er siedet unter Zersetzung bei 190° (i. D.).

Für den zu erwartenden Ester berechnet sich die

mentaranalysen befriedigende Zahlen gaben.

Berechnet:

Gefunden:

		I.	II.
C	53,79%	53,93%	53,66%
H	8,41%	8,56%	8,49%
Cl	19,87%	19,73%	19,83%.

**Ueberführen des  $\alpha$ -Chlorisobutylelessigsäure-Esters in  $\alpha$ -Oxyisobutylelessigsäure.**

Um von dem Ester zu der betreffenden Oxysäure zu gelangen, verseifte ich 4 g davon mit heiss gesättigtem Barytwasser, dem etwas Baryumcarbonat zugesetzt wurde, um beim Kochen das lästige Stossen zu verhindern. Nach zehnstündigem Erhitzen war die Verseifung beendet, der Rückstand wurde wiederholt mit Wasser ausgekocht, in der Lösung der überschüssige Baryt mit Kohlensäure gefällt und das erhaltene Baryumsalz in der Hitze genau mit der benötigten Menge Zinksulfat umgesetzt. Durch wiederholtes Auskochen des entstandenen Niederschlages erhielt ich das schwerlösliche Zinksalz der Oxysäure, welches beim Umkrystallisiren und Einengen der Lösung sich in seidenglänzenden Schuppen abschied, die mikroskopisch betrachtet aus feinen Nadeln bestanden. Das Salz krystallisirte mit zwei Molekülen Krystallwasser.

Berechnet für  $(C_4H_7O_3)_2Zn + 2H_2O$ :

Gefunden:

		I.	II.
Zn	17,99%	17,84%	17,81%
H <sub>2</sub> O	9,90%	9,57%	9,64%.

Die aus dem Zinksalze nach Ansäuern mit Schwefelsäure und Ausäthern gewonnene freie Säure schmolz bei 67—70°. Selbst nach öfterem Umkrystallisiren des Salzes erlangte ich keine Säure mit schärferem Schmelzpunkte.

Nach Waage<sup>1)</sup> schmilzt die aus activem Leucin erhaltene Oxysäure bei 73°, nach Gmelin<sup>2)</sup> die aus einem von Hefe und Casein abstammenden Leucin dargestellte active Oxysäure

<sup>1)</sup> Waage, Ann., Bd. 118, S. 87, 1861.

<sup>2)</sup> Gmelin, Zeitschr. f. physiolog. Ch., Bd. XVIII, S. 31, 1894.

bei 72,5°, die aus Hämoglobin erhaltene bei 67-70°. Die von mir erhaltene Säure stimmt in diesem Punkte mit der aus Hämoglobin dargestellten überein, doch weicht sie von dieser wieder durch den Wassergehalt des Zinksalzes ab, der bei Gmelin  $\frac{1}{2}$ , bei mir 2 Moleküle betrug. Der Grund dieser Verschiedenheiten ist bisher nicht aufgeklärt, doch will ich bemerken, dass das von mir bei der Gewinnung der Oxysäure benützte Leucin nicht ausschliesslich aus Keratin stammte, sondern zu einem kleinen Theil durch Selbstverdauung von Pancreas erhalten war.

Es ist danach nicht ausgeschlossen, dass das von mir benützte Präparat noch ein Gemenge verschiedener Leucine darstellte und dass auch die beschriebenen Chlorprodukte nicht ganz einheitlicher Natur waren. Auch die Bezeichnung  $\alpha$ -Chlorisobutylelessigsäure möchte ich für so lange als eine vorläufige ansehen, als die Isomerie der aus verschiedenen Eiweisskörpern und nach verschiedenen Methoden erhältlichen Leucine nicht genügende Klärung erfahren hat.

---

# Ueber die labende und labhemmende Wirkung des Blutes.

Von

Dr. E. Fuld

und Dr. K. Spiro, Privat-Doc. u. I. Assist. des Instituts.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 40.)

(Der Redaction zugegangen am 28. September 1900.)

---

## I.

Gelegentlich seiner Untersuchungen über die Blutgerinnung hat Hammarsten beobachtet, dass mit Pferdeblutserum versetzte Caseinlösung oder Milch nicht mehr gelabt werden kann, ein Befund, den alsdann Rödén<sup>1)</sup> zum Gegenstand ausführlicher Untersuchungen machte. Hammarsten selbst wies nach, dass nach wiederholtem Ausfällen und Auflösen das Casein einer so behandelten Milch wieder gelabt werden kann. Rödén zeigte, dass die Labhemmung bereits von sehr geringen Mengen Pferdeserum ausgeübt wird, und dass die Quantität Serum, welche die Wirkung einer bestimmten Quantität Lab dauernd aufhebt, von Thier zu Thier und noch mehr von Species zu Species schwankt. In einem Falle wurde eine Labmenge, welche die Kontrollprobe binnen zwölf Minuten zur Gerinnung brachte, bei einem Serumgehalt der Milch zu 1% vollkommen und dauernd unwirksam.

Bezüglich der Einflüsse, welchen das Serum ausgesetzt

---

<sup>1)</sup> Upsala Läkareförenings förhandlingar, Bd. 22, S. 546. Ein ausführliches Referat von Hammarsten siehe in Maly's Jahresbericht, Bd. 17, S. 160, 1887.

werden darf, ohne seine labhemmenden Eigenschaften einzubüssen, ist zu nennen: andauerndes Dialysiren, wobei das eingengte Dialysat keine Spur von Wirkung zeigt, und Erhitzen bis zu Temperaturen an 70°. Erhitzen über diese Temperatur hinaus und Stehenlassen unter Alkohol hob die Wirkung auf.

Bei Versuchen, die wirksame Substanz zu isoliren, gelangte Rödén nur zu negativen Resultaten: Weder mit dem durch Essigsäure aus Pferdeblutserum dargestellten Globulin, noch dem isolirten Serumalbumin konnte eine Wirkung erzielt werden, sodass Rödén am Schluss seiner Arbeit zu der Annahme gelangt, dass der Träger der genannten Wirkung zu den noch nicht bekannten Serumbestandtheilen gehöre. Ueber die Art der Wirkung kommt er zu dem Wahrscheinlichkeitsschluss, dass der Körper auf das Labferment selbst in irgend einer Weise einwirke. Ob diese Einwirkung in der Bildung einer chemischen Verbindung des Körpers mit Lab bestehe, konnte nicht bewiesen, aber auch nicht ausgeschlossen werden. Da beim Schütteln mit Thierkohle der wirksame Bestandtheil nicht niedergerissen wird, glaubt Rödén den Körper zu den Eiweissstoffen und nicht zu den Fermenten des Blutes rechnen zu müssen.

Eine Bestätigung und interessante Fortführung in bestimmter Richtung erfuhren die Versuche Rödén's durch Briot<sup>1)</sup> und namentlich durch J. Morgenroth.<sup>2)</sup> Letzterem besonders gelang es, ähnlich wie es H. Hildebrandt<sup>3)</sup> für das Emulsin gezeigt hatte, durch wiederholte subcutane Injection kleinerer Labdosen bei Ziegen eine erhebliche Menge eines labhemmenden Stoffes im Blutserum zur Anhäufung zu bringen und «seinen Wirkungswerth zahlenmässig zu bestimmen».

Er fand, dass durch Gegenwart dieses «Antilab's» die Coagulation der Milch mittelst pflanzlicher Labfermente nicht beeinträchtigt wird, und zeigte in einer zweiten Mittheilung,

---

1) Compt. rend. de l'Ac. d. sc. Bd. 128, S. 1359, 1899.

2) Centralblatt f. Bacteriol., I. Abth., Bd. 26, Nr. 11/12, S. 349, 1899, und ebenda Bd. 27, Nr. 20/21, S. 721, 1900.

3) Virchow's Archiv Bd. 131, S. 26, 1893.



falls die Erzeugung eines «Antikörpers» in analoger Weise gestattet, welcher seinerseits auf das gewöhnliche thierische Chymosin ohne Einfluss ist. Als Mass der Wirkung diene nicht, wie bei früheren Untersuchungen, die Gerinnungszeit, sondern die Grösse der kleinsten gerinnungsmachenden Labmengen für gewöhnliche Milch und solche, welcher die wirksame Flüssigkeit zugesetzt war.

Das verschiedene Verhalten des Pferdeblutserums gegenüber beiden Fermenten bringt Morgenroth in Vergleich mit dem Gehalt des Serums an specifischen Antitoxinen nach Zufuhr von Toxinen und deutet es unter Zugrundelegung von Ehrlich's «Seitenkettentheorie» als Folge einer specifischen Reaction des Organismus.<sup>1)</sup>

Bei dem besonderen Interesse, welches solche Reactionsvorgänge bieten, halten wir uns für berechtigt, die nachstehenden Beobachtungen mitzuthellen, welche darthun, dass im Pferdeblut neben dem schon früher nachgewiesenen labhemmenden Agens ein nach Art des Labferments wirkender Stoff vorhanden ist, und dass eine Trennung beider Agentien durch geeignete Fractionierungsmethoden erreicht werden kann.

In Betreff der Methodik sei bemerkt, dass wir nach Rödén's Vorgang zur Prüfung der labhemmenden Wirkung des Blutserums meist von ein und derselben Lablösung ausgingen. Um längere Zeit hindurch mit derselben Milch arbeiten zu können, conservirten wir sie durch Schütteln mit Chloroform (Benjamin);<sup>2)</sup> die labhemmende Wirkung des Chloroforms konnte ausser Acht gelassen werden, da es uns stets nur auf vergleichende Versuche ankam. Durch Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung wurde jedesmal für eine gleichmässige Verdünnung sämmtlicher Proben gesorgt.

Im Allgemeinen ergab sich, dass 0,1 ccm. Serum zur Neutralisation von 0,1 ccm. unserer Lablösung (resp. gleiche Verdünnungen) nicht ausreichte, 0,2 ccm. frischen Serums aber allemal genügten, wie beifolgende Protokolle zeigen.

1) Ebenso P. Ehrlich, Proc. Royal Soc. Vol. 66, S. 438, 1900.

2) Virchow's Archiv, Bd. 145, S. 30, 1896.

### Versuch I.

Lablösung mit Wasser auf  $\frac{1}{2}$  verdünnt, frisches Serum mit 0,8%iger Kochsalzlösung auf  $\frac{1}{2}$  verdünnt.

Milch ccm.	Lab ccm.	Serum ccm.	Befund
2	0,1	0,0	gerinnt
2	0,1	0,1	etwas später (20') geronnen
2	0,1	0,2	nach 8 Tagen ungelabt
2	0,1	0,3	ebenso alle mit höherem Serumgehalt.
u. s. w.			

### Versuch II.

Verdünnungen wie in Versuch I.

Milch ccm.	Lablösung ccm.	Serum ccm.	Befund
1,0	0,1	0,0	gelabt
1,0	0,1	0,1	Gerinnsel
1,0	0,1	0,2	fast kein Gerinnsel, klebriger Niederschlag
1,0	0,1	0,3	keine Gerinnung.
		u. höherer Zusatz	

### Versuch III.

Lablösung und Serum (etwas gestanden) unverdünnt.

Milch ccm.	Lab ccm.	Serum ccm.	Befund
1,0	0,2	0,5	keine Gerinnung nach 2 St.
1,0	0,5	0,5	reichliches Gerinnsel, in einem Parallelversuch Gerinnsel nur angedeutet
1,0	1,0	0,5	total geronnen.

### II.

#### Trennung des labenden und labhemmenden Stoffs.

Bei Wiederholung der Rödén'schen Versuche ergab sich, als wir, statt Serum von Pferdeblut, diffundirtes Oxaloplasma verwendeten, ein auffallendes Misßverhältniss zwischen Zusatz und labhemmender Wirkung. Manchmal hatte eine geringe Menge Plasma eine deutlichere Wirkung als eine grössere: bei Betrachtung der sich nach reichlichem Zusatz ausscheidenden Gerinnsel ergab sich weiter ein Unterschied

durch eine gleiche Menge Lab erzeugten Gerinnung; namentlich waren die Niederschläge flockig, Anfangs locker und contrahirten sich nur langsam.

Nachdem auch noch durch andere Beobachtungen eine coagulirende Wirkung des Plasma constatirt war, erhob sich naturgemäss die Frage, ob eine solche Wirkung nur dem Plasma, oder auch dem Serum innewohne und in letzterem Falle vielleicht bloss durch die stärkere labhemmende Wirkung verdeckt sei. Um diese Frage zu entscheiden, bedienten wir uns eines Chlorcalcium-zusatzes, dessen labungsfördernde Wirkung schon von Hammarsten erkannt worden ist; in der That gelang es so, und zwar nur so, durch grössere Serummengen eine, wenn auch langsame Labung zu erzielen, ähnlich wie Zufügung eines Kalksalzes auch beim Plasma die labende Wirkung deutlicher hervortreten liess.

#### Versuch IV.

Milch ccm.	Plasma ccm.	Lab. ccm.	B e f u n d
2	0,5	—	bleibt ungeronnen
2	1,0	—	»        »
2	1,5	—	am nächsten Tage kleines lockeres Gerinnsel
2	2,0	—	»        »        » zunehmendes locker. Gerinnsel
2	5,0	—	»        »        » gut abgesetztes Gerinnsel

Grössere Mengen Pferdeblutplasma können also bisweilen eine labende Wirkung ausüben, wie auch aus folgendem Versuch ersichtlich.

#### Versuch V.

Milch ccm.	Plasma ccm.	Kochsalz- lösung ccm.	B e f u n d
2	3	3	am nächsten Tage kleines Gerinnsel am Boden
5	3	—	»        »        » grosses Gerinnsel

Schneller tritt die Gerinnung ein, wenn noch Kalksalz zugesetzt wird.

### Versuch VI.

Gleiches Plasma wie in Versuch IV.

Milch ccm.	Plasma ccm.	CaCl <sub>2</sub> 10 %ig ccm.	B e f u n d
2	0,5	0,5	am nächsten Morgen frisch geronnen
2	1,0	0,5	nach 6 Stunden auftretendes Gerinnsel
2	1,5	0,5	Lockerer Coagulum, nach 6 Stunden vorhanden
2	2,0	0,5	Gerinnsel hat bereits nach 6 St. etw. Molke abgepresst
2	5,0	0,5	Contrahirtes Gerinnsel zu dieser Zeit

### Versuch VII.

Milch ccm.	Serum ccm.	CaCl <sub>2</sub> 10 %ig ccm.	B e f u n d
2	2	0,5	am nächsten Tage noch keine Gerinnung
2	3	0,5	» gleichen Tage beginnende Gerinnung
2	4	0,5	» gleichen Tage deutliches starkes Gerinnsel

### Versuch VIII.

Milch ccm.	Serum ccm.	CaCl <sub>2</sub> -Lösung 10 %ig ccm.	Kochsalz- lösung ccm.	B e f u n d
2,0	0,0	0,5	1,0	keine Gerinnung
2,0	0,2	0,5	0,8	gelblicher Bodensatz
2,0	0,5	0,5	0,5	einzelne Flocken
2,0	1,0	0,5	0,0	» deutliche Gerinnsel

In einem Kontrollversuch, in dem Plasma statt Serum angewandt wurde, war die Gerinnung wieder viel deutlicher zu erkennen.

Dass im Plasma und Serum zwei Factoren vorhanden sind, welche die Milchgerinnung in entgegengesetztem Sinne beeinflussen, erschwert natürlich in höchstem Maasse die Analyse der antilabenden Wirkung des Gesamtserums, und eine weitere Untersuchung wäre wohl aussichtslos gewesen,

mittelt Ammonsulfats die beiden Factoren getrennt in zwei verschiedenen Eiweissfractionen abzuscheiden.

Zunächst konnten wir uns überzeugen, dass die bei Halbsättigung mit Ammonsulfat nicht gefällten Bestandtheile ohne jede labhemmende resp. labbefördernde Einwirkung waren, wobei wir uns durch Kontrollversuche überzeugten, dass die durch Dialyse hervorgerufene Verdünnung nicht als Ursache für das Verschwinden der Hemmung angesehen werden konnte.

### Versuch IX.

Serum, 100 ccm., wird mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, filtrirt und das Filtrat dialysirt; dem Schlauche werden 192 ccm. entnommen; eine ebenfalls der Dialyse gleichzeitig unterworfenene Menge von 100 ccm. Serum wird ebenfalls auf 192 ccm. aufgefüllt.

#### A.

Milch ccm.	verd. Lab. ccm.	Dial. verdünnt. Serum ccm.	B e f u n d
2,0	0,2	0,1	bleibt ungeronnen
2,0	0,2	0,2	„ „
		0,3	„ „
2,0	0,2	0,4	„ „
		1,0	„ „

#### B.

Milch ccm.	verd. Lab. ccm.	Dial. Filtrat vom Globulin ccm.	B e f u n d
2,0	0,2	0,2	geronnen
2,0	0,2	0,4	„
2,0	0,2	0,6	„
2,0	0,2	0,8	„
2,0	0,2	1,0	„
2,0	0,2	2,0, 3,0, 4,0, 6,0	„

Durch Kochsalzlösung war gleichmässige Verdünnung erzielt.

Ebenso zeigte ein Versuch die Abwesenheit einer labähnlichen Wirkung im Globulinfiltrat.

Auch durch Sättigung mit Ammonsulfat gefälltes und mittelst Dialyse aufgelöstes Albumin übte selbst in grösseren Mengen keine Einwirkung auf die Milchgerinnung aus.

Hiermit war das Fehlen beider Agentien in der Albumin-fraction dargethan, was mit dem Befunde Rödén's übereinstimmt, welcher gereinigtes Serumalbumin ohne Wirkung auf die Labgerinnung fand. Beide wirksamen Agentien waren also in der leichter fällbaren Fraction zu suchen. Nun finden sich aber in dieser Fraction, soviel bisher ersichtlich, drei verschiedene Eiweisskörper, die meist den Globulinen beigezählt werden:

1. das Fibrinoglobulin Hammarsten's, welches sich nach W. Reye<sup>1)</sup> durch 28%ige Sättigung mit Ammonsulfat von den anderen Globulinen trennen lässt;
2. ein durch Dialyse ausfällbares Globulin («Euglobulin»);
3. ein durch Dialyse nicht fällbares Globulin («Pseudoglobulin»), welches mit dem sub 2. genannten Körper zusammen das «Paroglobulin» (Serumglobulin nach üblichem Sprachgebrauch) darstellt.

Betreffs der an zweiter und dritter Stelle genannten Fractionen, welche bisher nicht mit Sicherheit auseinandergehalten werden konnten, muss an dieser Stelle folgendes bemerkt werden: Bekanntlich scheidet sich bei anhaltender Dialyse einer salzhaltigen Globulinlösung ein Theil als Niederschlag ab. Schon vor einer Reihe von Jahren hat A. E. Burkhardt<sup>2)</sup> Versuche mitgetheilt, welche ihm eine Verschiedenheit des durch Dialyse fällbaren und des in Lösung bleibenden Anthells wahrscheinlich machten, doch gelang es Hammarsten,<sup>3)</sup> die erhobenen Einwände so zu entkräften,

---

<sup>1)</sup> Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Inaug.-Diss. Strassburg. 1898.

<sup>2)</sup> Beiträge zur Chemie und Physiologie des Blutserums. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmacol. Bd. 16, S. 332, 1883.

<sup>3)</sup> Ueber die Anwendbarkeit des Magnesiumsulfats. Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. VIII, S. 467, 1884.

scheinung gestützt, dass die Antitoxinwirkung des Diphtherieheilserums dem bei der Dialyse in Lösung bleibenden Antheil anhaftet, auf Burkhardt's Vorstellung zurückgriff und sie durch quantitative Versuche zu stützen suchte. Eine zuverlässige Methode zur Trennung beider Antheile fehlte jedoch.

Bei Gelegenheit von Versuchen, die in ganz anderer Richtung unternommen waren, hat der Eine von uns (S.) in Gemeinschaft mit Herrn cand. med. Bruno Haake ein Verfahren zur Trennung durch Salzfractionirung aufgefunden. Während das durch Dialyse leicht fällbare Globulin bei Halbsättigung mit Kaliumacetat ausfällt, bleibt der durch Dialyse nicht fällbare, von Marcus als «albuminähnlich» bezeichnete Stoff noch in Lösung. Ein zweites, bequemerer Verfahren gewährt uns auch hier die Fractionirung mit Ammonsulfat; die Fällungsgrenzen des ersten Körpers liegen im Allgemeinen zwischen 28 und 33%iger, die des anderen bei 34—46%iger Sättigung. Ohne uns auf die chemische Charakterisirung der so darstellbaren Eiweissstoffe einzulassen, welche Herr Haake erbringen soll, wollen wir nur erwähnen, dass der albuminähnliche Stoff in den bisherigen Präparaten stets etwas phosphorhaltig gefunden wurde. Herr Professor Hofmeister hat uns vorgeschlagen, den durch Halbsättigung mit Kaliumacetat, Essigsäure und Dialyse fällbaren Eiweisskörper wegen seiner typischen Globulineigenschaften anlehnend an die Terminologie der Botaniker als «Euglobulin», den durch Dialyse und Halbsättigung mit Kaliumacetat nicht fällbaren, albuminähnlichen Körper als «Pseudoglobulin» zu bezeichnen.

Nach Massgabe der angeführten Zahlen werden die beiden Globulinfractionen aus Pferdeserum hergestellt, die wiederholt

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 559, 1899. Vergl. auch Seng (Koch und Flügge's Zeitschr. für Hygiene und Infektionskrankh. Bd. 31, 1899) und Ide u. Lemaire, Archiv. int. de pharmacodynamie. Bd. 6, S. 477, 1899.

gefällten und gut abgepressten Niederschläge im 20fachen Gewicht 0,92%iger Kochsalzlösung aufgelöst und unter Toluol aufbewahrt;<sup>1)</sup> bemerken möchten wir hierbei, dass auch ohne Zusatz von desinficirenden Mitteln das Pseudoglobulin keine spontane Fäulniss zeigte.

In Betreff der Labwirkung verhielten sich nun die drei Fractionen verschieden; während der Fibrinoglobulinfraction keine constanten Wirkungen in der einen oder andern Richtung zukamen, erwies sich die Euglobulinfraction meist fähig, Milch ihrerseits zum Gerinnen zu bringen, die Pseudoglobulinfraction aber zeigte mehr oder weniger ausgesprochene labhemmende Wirkung.

So ist es auch vielleicht verständlich, dass Rödén die labhemmende Wirkung beim «Globulin» vermisste, denn er hatte es durch Säurefällung dargestellt, wobei vorwiegend Euglobulin ausfällt, während die labhemmende Pseudoglobulinfraction in Lösung bleibt; in der That fand er im Filtrat von seiner Essigsäurefällung die Wirksamkeit unbeeinträchtigt. Sein Albumin, welches sich unwirksam erwies, hatte er nach Ausfällung des Gesamtglobulins mit Magnesiumsulfat durch Essigsäure niedergeschlagen. Die Eigenschaften, welche man nach diesen Versuchen der wirksamen Substanz zuschreiben muss, Fällbarkeit durch Magnesiumsulfat und Löslichkeit in stark verdünnter Essigsäure, finden sich in der That bei dem von uns nachgewiesenen Pseudoglobulin wieder.

### III. Ueber die labähnliche Substanz des Blutserums.

Wenn grössere Mengen der in physiologischer Kochsalzlösung gelösten Euglobulinfraction zu Milch gesetzt wurden, z. B. 5 ccm. auf 2 ccm. Milch, so trat fast regelmässig — bisweilen erhielten wir eine unwirksame Euglobulinfraction aus dem wirksamen Plasma — nach einigen Stunden bis Tagen Gerinnung ein, z. B.

---

1) Dass die geringen anhaftenden Ammonsulfatmengen für unsere Beobachtungen ausser Acht gelassen werden können, geht aus dem Verlauf der mitzutheilenden Untersuchungen sowie aus eigens angestellten Kontrollversuchen hervor.



Milch ccm.	Kochsalz- lösung ccm.	Fibrino- globulin ccm.	Euglobulin ccm.	Pseudo- globulin ccm.	Befund (nach 20 Stunden)
2,0	3,0	—	—	—	flüssig
2,0	—	3,0	—	—	„
2,0	—	—	3,0	—	geballtes Gerinnsel
2,0	—	—	—	3,0	flüssig

Beschleunigt wurde auch hier dieser Erfolg durch Zusatz von Chlorcalcium.

### Versuch XI.

Alle Proben mit 0,5 ccm. einer 10%igen Chlorcalciumlösung versetzt.

Milch ccm.	Kochsalz- lösung ccm.	Fibrino- globulin ccm.	Euglobulin ccm.	Pseudo- globulin ccm.	Befund
2,0	3,0	—	—	—	flüssig
2,0	—	3,0	—	—	„
2,0	—	—	3,0	—	nach 6 Stunden voluminöser Niederschl.
2,0	—	—	—	3,0	flüssig

Wir haben behufs Charakterisirung des wirksamen Körpers die Euglobulinfraction verschiedenen üblichen Eingriffen unterworfen und dabei gefunden, dass die Wirkung durch Erhitzen auf 65—70° verloren geht, durch vorübergehendes Ansäuern geschwächt wird, dagegen auffälliger Weise durch entsprechende Alkalibehandlung stark zunimmt.

### Versuch XII.

Je 20 ccm. 5%iger Euglobulinlösung werden 4 Stunden mit 10 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normalschwefelsäure resp. Natronlauge stehen gelassen und alsdann mit dem gleichen Volumen  $\frac{1}{10}$  Normal-lauge resp. -Säure neutralisirt.

A.

Mit Säure behandeltes Euglobulin.

Milch ccm.	Euglobulin- lösung ccm.	10%ige Chlor- calcium- lösung ccm.	Befund
1,0	5,0	0,0	Nach 2 Stunden wenige feine Flocken » 12 » reichliche Coagulation
1,0	5,0	0,5	» 2 » nichts » 12 » reichliche Coagulation

B.

Mit Alkali behandeltes Euglobulin.

Milch ccm.	Euglobulin- lösung ccm.	10%ige Chlor- calcium- lösung ccm.	Befund
1,0	5,0	0,0	Nach 2 Stunden feinflockiger reichlicher Niederschlag
1,0	5,0	0,5	Nach 2 Stunden abgesetzter, grobflockiger reichlicher Niederschlag

C.

Die Euglobulinlösung wird  $\frac{1}{2}$  Stunde auf 70° erhitzt, das Filtrat zum folgenden Versuch verwandt.

Milch ccm.	Euglobulin- lösung ccm.	10%ige Chlor- calcium- lösung ccm.	Befund
1,0	5,0	0,0	Nach 12 Stunden nichts
1,0	5,0	0,5	» 12 » keine Veränderung

Um jedes Versehen bei der Neutralisation ausschliessen zu können, wurde der Versuch B mehrfach in der Art wiederholt, dass nur 9,9 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normalsäure zu der mit 10 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normalkalilauge versetzten Euglobulinlösung gesetzt wurden, der Erfolg war unverändert; in der chlorcalciumhaltigen Milch-Euglobulinmischung traten nach 20 Minuten bereits Flocken

nach einigen Stunden ein massiger Niederschlag.

Mehr beiläufig sei hier bemerkt, dass bei der Neutralisation einer der Säurewirkung ausgesetzten salzhaltigen Euglobulinlösung sich ein reichlicher feinflockiger Niederschlag nach einiger Zeit ausschied, während das Pseudoglobulin bei gleichem Verfahren nur wenig opalescent wurde.

Dass auch Serum, welches der Alkalibehandlung unterworfen war, hierdurch ebenfalls in seiner labenden Wirkung verstärkt wurde, konnten wir uns durch besondere Versuche überzeugen.

### Versuch XIII.

20 ccm. Serum in derselben Weise behandelt wie Euglobulin in Versuch XII.

Milch ccm.	Serum ccm.	Chlor- calcium- lösung ccm.	Befund
2,0	1,0	0,0	In allen Proben, etwa gleichzeitig nach einigen Stunden, feinflockige Aus- scheidung.
2,0	2,0	0,0	
2,0	3,0	0,0	
2,0	4,0	0,0	
2,0	1,0	0,5	
2,0	2,0	0,5	
2,0	3,0	0,5	

Sprechen schon die angeführten Thatsachen dafür, dass wir es bei dem labähnlich wirkenden Körper mit einem Ferment zu thun haben, so wird dies durch nachstehende Versuche noch wahrscheinlicher gemacht.

Wurde von dem entstandenen Niederschlag abfiltrirt, so führte das Filtrat, zu einer neuen Milchprobe gesetzt, neuerdings in ganz gleicher Weise Gerinnung herbei. Das wirksame Agens wird sonach bei seiner Wirkung anscheinend nicht verbraucht, der entstandene Niederschlag stellt auch nicht eine Verbindung von Casein mit dem wirksamen Agens dar. Dementsprechend haben uns auch anderweitige Versuche ergeben,

dass die Quantität des ausfallenden Niederschlags, vorausgesetzt natürlich, dass man mit ausreichenden Serummengen arbeitete, direkt und allein in Proportion steht zur Quantität der verwendeten Milch.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Gerinnungswirkung im vorliegenden Fall, wie beim Chymosin, von der Mitwirkung der Kalksalze abhängig ist.

#### Versuch XIV.

100 ccm. Milch wurden nach den Angaben von Arthus und Pagès<sup>1)</sup> mit einer kleinen Menge Kaliumoxalat entkalkt und gegen destillirtes Wasser dialysirt, die so erhaltene salzfreie Milch mit Lab und wechselnden Mengen Euglobulin versetzt. Nach 12 stündigem Stehen wurde zu jeder Probe 0,5 ccm. 10%ige Chlorcalciumlösung hinzugegeben, wonach sich innerhalb von wenigen Minuten, etwa im Verhältniss zum Globulingehalt der Lösung, feine Flocken ausschieden, wenn auch weder so reichlich, noch so fest wie in der Kontrollprobe mit Chymosin.

Milch (dialysirt) ccm.	Lablösung ccm.	Kochsalz- lösung ccm.	Euglobulin ccm.	Befund nach 12 Stunden, Zusatz von 0,5 ccm. 10%iger Chlorcalciumlösung.
2,0	0,2	ad 6,0	0,0	sofortige Ausscheidung
2,0	0,0	» 6,0	2,0	feine Flöckchen
2,0	0,0	» 6,0	4,0	mehr »
2,0	0,0	» 6,0	6,0	reichliche »
2,0	0,0	» 6,0	—	nichts

Einen noch besseren Erfolg erzielten wir bei der folgenden Versuchsanordnung: durch anhaltendes Kochen soll nach den verschiedensten Autoren die Milch ihre Fähigkeit verlieren, durch Lab coagulirt zu werden.<sup>2)</sup> Dies beruht nach Eugling und Söldner<sup>3)</sup> auf dem Unlöslichwerden des Kalkphosphats (Bildung von Tricalciumphosphat). Kontrollproben gleicher Zusammensetzung (mit ungekochter Milch) zeigten nach wenigen Stunden mit und ohne Chlorcalciumzusatz schöne Labung,

<sup>1)</sup> Arch. de physiol. norm. et path., Bd. 22, S. 331, 1890.

<sup>2)</sup> Eugling, Landwirthschaftliche Versuchsstationen, Bd. 31, S. 391, 1885.

<sup>3)</sup> Ebenda, Bd. 35, S. 351, 1888.

unverändert waren. Nach Zusatz von 0,5 ccm. Chlorcalciumlösung schied sich alsbald der Käse aus ihnen feinflockig ab.<sup>1)</sup>

Aus diesen und später mitzutheilenden Versuchen geht hervor, dass man sich den Verlauf der Milchlabung durch Euglobulin im Wesen nicht anders vorzustellen haben wird, als denjenigen bei der Labung durch die bisher beschriebenen Fermente. Ob dieses labende Agens im natürlichen Serum als Zymogen vorgebildet ist und, wie es den Anschein hat, erst, z. B. durch Alkaliwirkung, in das Enzym übergeführt wird, möchten wir nicht entscheiden. Dass man jedoch das im Blute gefundene Lab vorläufig nicht mit dem echten Chymosin identificiren darf, geht sowohl aus der etwas anderen Beschaffenheit des Gerinnsels hervor, als auch aus der von uns ermittelten Thatsache, dass das Chymosin sich gegen Salzfällung ganz anders verhält, da es sich erst bei 80—100% Sättigung mit Ammonsulfat ausscheidet.

Das Vorkommen von labähnlichen Fermenten im Harn ist von Holovotscheiner und Helves<sup>2)</sup>, in den Organen des Thierkörpers von Halliburton und Brodie<sup>3)</sup> und namentlich von A. Edmunds<sup>4)</sup> studirt worden; dass dem Papayotin und dem Pankreassaft Labwirkung zukommt, ist wesentlich durch Kühne<sup>5)</sup> und Wittmack<sup>6)</sup> bekannt. Zur Ergänzung sei bemerkt, dass wir im Presssaft und im Toluolkoehsalzauszug von Schweinsnebennieren eine deutliche, durch Chlorcalcium verstärkbare Labwirkung nachweisen konnten. Der labende Stoff liess sich auch hier durch  $\frac{1}{8}$ -Sättigung mit Ammonsulfat concentriren. Es muss dahingestellt bleiben, ob es sich um ein

---

1) Bemerkt muss werden, dass eine Probe gekochter Milch mit reichlichem Papayotinzusatz schnell und typisch gelabt wurde.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 43, S. 384, 1888.

3) Journ. of Physiology, Bd. 20, S. 97, 1896.

4) Ebenda, Bd. 19, S. 466, 1896.

5) Verhandl. d. naturhist.-med. Vereins z. Heidelberg. N. F., Bd. 3, S. 3, 1878.

6) «Milchgerinnungsmittel». Hannoversch. Land- und Forstwirthschaftl. Vereinsblatt, 1878, Nr. 33. Citirt nach Maly, Bd. 8, S. 137.

ganz constantes **Vorkommniß** handelt. Herr Dr. Conradi, welcher analoge **Versuche** mit digerirten Rindernebnieren, nicht wie wir mit Schweinsnebnieren angestellt hat, fand einen deutlich labhemmenden Factor in ihnen; falls es sich um einen constanten **Befund** handelt, ein merkwürdiger Gegensatz zu der **Wirksamkeit** der betreffenden Blutsera (Rödén).

Eine milchcoagulirende **Wirkung** von Serum, der Angabe Morgenroth's<sup>1)</sup> nach von specifischer Natur, hat Bordet<sup>2)</sup> durch subcutane Injection von Milch bei Thieren erzielt; eine Discussion der Beziehungen dieses «Coagulins» zu normalem Serumlab wird man bis zum Erscheinen einer angekündigten ausführlichen Mittheilung verschieben müssen.

#### IV.

##### **Die labhemmende Wirkung der Pseudoglobulinfraction.**

Wie oben erwähnt, gelang es, durch Salzfractionirung die labhemmende Wirkung an eine einzige Fraction, diejenige des Pseudoglobulins zu binden. Doch war die Wirkung der so erhaltenen Lösungen stets eine schwächere, als erwartet werden konnte, zumal im Hinblick auf die Wegschaffung des antagonistisch wirkenden labähnlichen Fermentes.

Bezüglich der Eigenschaften des «Antilabs» haben wir, wie zum Theil schon Rödén und Morgenroth, gefunden, dass das Serum, zumal beim Stehen in der Wärme, seine labungshemmenden Eigenschaften nach und nach verliert. Die reine Pseudoglobulinlösung allerdings lässt sich wochenlang ohne Veränderung aufbewahren, was von dem Lab der Euglobulinfraction nicht gesagt werden kann. Durch vorübergehendes Verweilen unter Alkali oder Säure büsst sie zum Theil ihre Wirksamkeit ein. Sie verträgt Erhitzen unterhalb 70°, sowie Dialyse und passirt das Chamberland-Filter.

Durch Zusatz geringer Mengen Chlorcalcium wird die **Wirksamkeit** des «Antilabs» aufgehoben, ein auffallendes Ver-

---

<sup>1)</sup> cf. Ehrlich l. c. S. 439.

<sup>2)</sup> Arch. de l'Inst. Pasteur, Bd. 13, S. 224, 1898.

dass die abnehmende Wirkung möglicher Weise auf einer Calciumentziehung beruht.

### Versuch XV.

Milch ccm.	Pseudoglobulinlösung	ccm.	Lab.	Befund
1,0	erhitzt auf 70°. . . .	5,0	0,1	nach 12 St. keine Gerinnung.
1,0	diffundirt . . . . .	5,0	0,1	» 12 » » »
1,0	durch Chamberland- Kerze filtrirt . . . . .	5,0	0,1	» 12 » » »
1,0	nach Alkalieinwirkung.	5,0	0,1	» 12 » » »
1,0	nach Säureeinwirkung	5,0	0,1	» 12 » » »

Wie wir durch Hammarsten wissen, verläuft der Process der Käsegerinnung in zwei Phasen, nämlich der Paracaseinbildung und der Paracaseincalciumfällung. Sehr scharf haben auch Arthus und Pagès<sup>1)</sup> diesen Unterschied gefasst.

Bei niederer Temperatur (Kühlung in Eiswasser) fällt eine Paracaseinlösung nicht mehr durch  $\text{CaCl}_2$ . Die Wichtigkeit dieser Beobachtung für jede Aufstellung eines gesetzmässigen Einflusses der Temperatur auf die Wirkungsgeschwindigkeit des Ferments ist augenscheinlich.

Auch dürfte sie geeignet sein, in ungezwungener Weise die interessante Angabe Morgenroth's<sup>2)</sup> über ein eigenthümliches «Verhalten des Labenzym's zur Milch» zu erklären, wonach Milch, welche bei 0° mit Lab gestanden hat und äusserlich keine Veränderung erkennen lässt, beim Erwärmen augenblicklich coagulirt.

Es ergab sich mithin die Frage, ob das Antilab schon der ersten Phase entgegenwirke oder erst der zweiten. Man hat zur Entscheidung nur nöthig, eine und dieselbe Milch-Lab-Pseudoglobulinmischung einmal mit und daneben ohne

<sup>1)</sup> Arthus und Pagès, Archives de Physiologie, 5<sup>e</sup> série, T. II, p. 330, 1890.

<sup>2)</sup> J. Morgenroth, Archives internationales de Pharmacodynamie, Vol. VII, p. 265, 1900.

Chlorcalcium anzusetzen und gleichzeitig oder kurz nach der Abscheidung des Käses in der ersten Probe, der zweiten Chlorcalcium zuzufügen; eine unmittelbar folgende Käseabscheidung musste die durch Lab erfolgte Bildung von Paracasein auch bei Anwesenheit von Antilab anzeigen. Bei wiederholten Versuchen konnte Letzteres in der That immer wieder constatirt werden.

### Versuch XVI.

#### A.

Milch ccm.	Cynarase-1) lösung ccm.	Serum ccm.	Chlorcalciumlsg. (10%) ccm.	Befund
2,0	0,1	0,1	0,5	Nach 20 Minuten Labung.
2,0	0,1	{ 0,2 resp. 0,3 — 0,5 }	0,5	„ 20 „ „

#### B.

2,0	0,1	0,1 resp. 0,2 — 0,5	—	nach einer Stunde ungeronnen, dann auf Zusatz von 0,5 ccm. Chlorcalciumlösung fast momentane Käsebildung.
-----	-----	------------------------	---	---

#### C.

Milch ccm.	Cynarase- lösung ccm.	Pseudo- globulin- lösung ccm.	Chlorcalciumlsg. (10%) ccm.	Befund
2,0	0,1	3,0	0,5	Nach 20 Minuten lockeres Gerinnsel.
2,0	0,1	3,0	—	Keine Gerinnung, nach einer Stunde Chlorcalciumzusatz, fast momentane Käsebildung.

Die andere Paracaseinreaction, Fällbarkeit durch Kochen, fiel ebenfalls positiv aus. In genau der beschriebenen Weise verliefen zahlreiche Versuche, die mit Chymosin, resp. Papayotin oder Euglobulin an Stelle der Cynarase angesetzt wurden. Wir

1) Für die freundliche Ueberlassung einer Quantität Cynarase sagen wir den Herren Geh.-Rath Prof. Dr. P. Ehrlich und Dr. J. Morgenroth unsern besten Dank.



verzichten auf die Beifügung besonderer Protokolle: stets zeigte, wenn in diesen Fällen auf Zusatz von Antilab die Gerinnung ausgeblieben war, die auf nachträglichen Chlorcalciumzusatz eintretende Fällung, dass trotz Anwesenheit des Antilabs Bildung von Paracasein erfolgt war.

Mit dieser Auffassung steht anscheinend der Befund Rödén's in Widerspruch, dass Lab und Serum sich (wenigstens annähernd) nach bestimmten Proportionen neutralisiren, sodass weiterer Labzusatz zu einem nicht mehr labenden Gemenge Gerinnungen hervorruft. Durch besondere Versuche überzeugten wir uns, und zwar unter Zusatz einer erheblichen Menge Serums, von der vollkommenen Richtigkeit dieser Angaben sowohl für das Chymosin wie für das Papayotin. Wir geben das Protokoll des letzteren Versuchs:

#### Versuch XVII.

Milch ccm.	Serum ccm.	Papayotinlösung ccm.	Befund
1,0	1,0	0,2	nach 2 Stunden geringe Ausscheidung.
1,0	1,0	0,3	» 2 » etwas mehr »
1,0	1,0	0,5	» 2 » stärkere » , aber noch unvollständig.

Für unsere Versuche können wir freilich eine Erklärung dieser Ausnahme geben, es erwiesen sich nämlich die verwendeten Lösungen von käuflichen Labpulvern als kalkhaltig.

Wenn unsere Vermuthung über das Zustandekommen der Antilabwirkung richtig ist, so muss ein bestimmtes Volumen ausreichen, das Calcium eines bestimmten Volumens Milch zu binden und so die Käsebildung zu verhindern, während bei weiterem Milchzusatz die von diesem mitgebrachte Calciummenge die Paracaseinausscheidung ermöglichen müsste. In der That ergab der Versuch, dass durch ein und dieselbe Serum-Labmischung kleinere Milchmengen nur zu dürrtiger Flockenausscheidung gebracht wurden (die nach Chlorcalciumzusatz viel reichlicher wurden), während vielmals grössere Milchmengen, für die man eher an eine Insufficienz der Labmengen

~~hätte~~ denken können, vollständig gerannen. In ganz derselben Weise liess sich auch das vom Serum in Lösung gehaltene Paracasein durch Zusatz eines weiteren Milchquantums ab scheiden.

### Versuch XVIII.

Milch ccm.	Serum ccm.	Lab ccm.	Befund
1,0	0,5	0,5	nach 2 Stunden Gerinnung angedeutet.
2,0	0,5	0,5	» 2 » keine Veränderung.
3,0	0,5	0,5	» 2 » Flocken.
4,0	0,5	0,5	» 2 » Flocken.
10,0	0,5	0,5	» 2 » klumpiges Gerinnsel.

Es bleibt naturgemäss die Frage zu erledigen, ob die labhemmende Wirkung dem Pseudoglobulin selbst oder einem beigemengten, vielleicht fermentartigen Stoffe zukommt.

Trotz der Zerstörbarkeit des wirksamen Stoffes durch hohe Temperatur scheint uns die Annahme eines Fermentes nicht geboten, da eine ähnliche Hemmung der Labgerinnung durch calciumentziehende, nicht fermentartige Stoffe hinreichend bekannt ist, Veränderlichkeit durch Hitze aber auch bei nicht fermentartigen Stoffen vorkommt.

Für die Annahme, dass es das Pseudoglobulin selbst ist, welches kalkentziehend und damit labhemmend wirkt, lässt sich Einiges anführen:

Das Pseudoglobulin coagulirt bei 68—72°. Nun ist das gerade jene Temperatur, bei welcher nach Rödén das Serum seine labhemmende Wirkung verliert; ferner besitzt das Pseudoglobulin die Fähigkeit, Kalk zu binden und zähe festzuhalten. Bei der Darstellung aus Plasma mit Kaliumacetat wird es mit einem merklichen Calciumgehalt gewonnen; dabei scheint das Calcium an Phosphorsäure im Moleküle gebunden zu sein, wenigstens gelang es, durch verdünnte Alkalien aus den Pseudoglobulinlösungen Calciumphosphat abzuscheiden. (Es ist somit möglich gewesen, zu zeigen, dass das gelöste Calciumphosphat

des Blutes, wie Kühne<sup>1)</sup> und Fokker<sup>2)</sup> angenommen resp. wahrscheinlich gemacht haben, an einen bestimmten Eiweisskörper geknüpft ist.) Bei der Ammonsulfatfractionirung wurde der Körper kalkarm resp. kalkfrei erhalten.

Indessen begegnet der Versuch, die Pseudoglobulinwirkung in Analogie mit derjenigen des Oxalats zu setzen, einer gewissen Schwierigkeit, insofern als dieses und, wie man annimmt, auch die anderen kalkanziehenden Stoffe, wie Fluornatrium, Seifen und dgl., das Calcium als unlösliche Verbindung aus der Flüssigkeit entfernen, während die vermuthete Pseudoglobulinkalkverbindung in Lösung bleibt. Doch scheint sich auch hierfür eine Analogie darzubieten in dem Verhalten des Peptons und der Citrate.

Die labhemmende Wirkung des Peptons wurde zuerst beschrieben von Gley<sup>3)</sup> und von Edmunds<sup>4)</sup> und in der Folge mehrfach bestätigt.

Diese Wirkung findet nicht statt, wenn von vornherein ein Ueberschuss an löslichen Kalksalzen vorhanden ist. Trotzdem glaubt Locke<sup>5)</sup> nicht an eine Betheiligung des Kalks bei der Peptonwirkung aus dem Grunde, weil dieses mit Kalksalzen nicht ausfällt.

In ähnlicher Weise glaubte A. Edmunds<sup>6)</sup> den Gedanken an eine Kalkbindung durch Pepton widerlegen zu können, mit dem Hinweise auf die Unlöslichkeit des Käsegerinnsels in Peptonlösungen und die Löslichkeit desselben in Oxalat.

Doch lassen sich gegen beide Gründe einige Bedenken anführen: Auch das Kalkcitrat bleibt lange Zeit (selbst wochenlang) in Lösung und kann trotzdem zur Käsebildung nicht dienen. Andererseits kann offenbar aus der Löslichkeit des Käses in einem Stoffe nichts über den Einfluss desselben auf die Käsebildung ohne Weiteres geschlossen werden.

Indessen gelangten auch wir zu der Annahme, dass die

---

1) Lehrbuch der physiologischen Chemie, Berlin 1868, S. 184.

2) Pflüger's Archiv., Bd. 7, S. 274, 1873.

3) Compt. rend. d. l. soc. d. biol., 1896, S. 591.

4) Journ. of Physiol., Bd. XIX, S. 474, 1896.

5) Journ. of exp. Medicine, Bd. 2, Nr. 5, S. 493, 1897.

6) Journ. of Physiology, Bd. 19, S. 460, 1896.

Wirkung des Peptons nicht das Calcium betrifft und zwar auf Grund folgender Beobachtung: In der nicht gerinnenden, mit Lab versetzten Milchpeptonmischung kann durch Calciumchlorid kein Paracasein nachgewiesen werden.

Dagegen lässt sich zwischen Pseudoglobulin und Citrat eine Analogie erkennen; wie man allgemein die Existenz eines Calciumcitrats in der Lösung zugibt, dessen Calcium-Jonen für die Paracaseinfällung nicht mehr herangezogen werden, so möchten wir eine Pseudoglobulincalciumverbindung von ähnlichem Charakter annehmen. Wir konnten dies näher belegen, indem wir phosphorsaures oder kohlensaures Natron zu Pseudoglobulincalcium setzten. Dabei trat kein Niederschlag von Kalksalz auf. Dass nicht, wie wir Anfangs vermutheten, die colloidale Natur des gelösten Stoffes an der Behinderung der Reaction schuld ist, lässt sich, ausser durch die unten folgenden Oxalatversuche, in der Art zeigen, dass in entsprechenden und sogar concentrirteren Lösungen des Euglobulins die Ausfällung des Kalks als Carbonat u. s. w. mit Leichtigkeit stattfindet.

Genau die gleichen Verhältnisse wie beim Pseudoglobulin fanden wir bei der Citronensäure vor, so dass in dieser Hinsicht eine vollkommene Aehnlichkeit zwischen beiden Stoffen besteht. Dagegen scheint die Anwesenheit von Pepton im Lösungsmittel für die Kalkfällung ganz gleichgültig zu sein, sodass die Einwirkung des Peptons auf die Labgerinnung, wie auch schon oben nachgewiesen wurde, derjenigen des Pseudoglobulins und der Citrate sich nicht anschliesst. Ferner wurde gefunden, dass Milch nach Beimischung eines gleichen Volumens gesättigter, neutralisirter Wittepeptonlösung beim Kochen gerinnt. Ein solches Gemenge wird durch  $\text{CaCl}_2$  nicht gefällt; auch Paracasein verliert durch das Stehen mit Peptonlösung seine Fällbarkeit durch Kalksalz. Aus all diesem geht hervor, dass durch das Verweilen unter Pepton mit dem Casein der Milch eine leichte Veränderung vorgeht, welche mit der gewöhnlichen Paracaseinbildung nicht identisch ist.

Weiter sind wir auf diese Frage nicht eingegangen, nur liess sich zeigen, dass reine Heteroalbumose auch in gesättigter Lösung die Labgerinnung nicht beeinflusst.

lässt sich aus einer Paracaseinlösung der Käse vermittelst einer Lösung von  $\text{CaCl}_2$ , z. B. in Pepton sehr leicht niederschlagen. Dagegen fällt das Kalksalz bei Gegenwart eines Ueberschusses von Pseudoglobulin kein ~~Paracasein~~ aus.

Die oben ~~angedeutete Analogie~~ mit der Citratwirkung legte einen Versuch über die Wirkung des Pseudoglobulins auf die Blutgerinnung nahe.

Einem Kaninchen wurde Blut aus der Carotis entnommen. Sechs Proben zu je 1 ccm. wurden aufgestellt und drei davon mit 3 ccm. physiologischer Kochsalzlösung versetzt, die drei andern mit 3 ccm. 5%iger Pseudoglobulinlösung.

Die Kontrollproben gerannen nach 29, 33 und 34 Minuten zu einem typischen, festen Fibringerinnsel. Von den Proben mit Pseudoglobulin zeigten zwei eine deutliche Verzögerung in dem Auftreten der Gerinnung; die eine war nach 1 Stunde, die zweite nach  $3\frac{1}{2}$  Stunden noch ungeronnen.

In beiden Proben, welche ein Gerinnsel enthielten, war dieses nicht von der gewöhnlichen Beschaffenheit, sondern stellte eine verschiebliche, gelatinös-sulzige Masse dar.

In einer ungeronnenen Probe gelang es uns, durch Zusatz einer Spur von  $\text{CaCl}_2$  (ähnlich wie nach Oxalatbehandlung des Fibrinogens) eine typische feste Gerinnung einzuleiten. Wiederholung beider Versuche lieferte ganz gleiche Resultate.

Hiernach ist anzunehmen, dass das Pseudoglobulin entsprechend seiner Fähigkeit, Kalk gelöst zu halten, auch eine hemmende Wirkung auf die Blutgerinnung ausübt. Dem Serum wohnt also nicht nur eine «antilabende» Wirkung inne, sondern auch eine «antithrombische».

Letztere hat bereits Pekelharing<sup>1)</sup> gesehen und zwar ebenfalls, wie wir es ausdrücken würden, in der Pseudoglobulinfraction. Auch er fand, dass Fibrinogen, in eine anhaltend dialysirte Serumglobulinlösung gebracht, nicht zu Fibrin wird, ausser wenn das Globulin mit einem Kalksalz digerirt war. Doch können wir seiner Deutung, dass aus Globulin und Kalk Fibrinferment werde, nicht beitreten.

Auch hier verhält sich das Casein wie das Pseudoglobulin und erhält frisch aus der Ader gelassenes Blut flüssig. Das zur Verwendung kommende Casein wurde ohne Säurezusatz durch Aussalzung mit Ammonsulfat aus Milch gewonnen, durch Umfällen gereinigt, abgepresst und in viel Wasser gelöst.

---

<sup>1)</sup> Mededeel. d. Kon. Akad. van Wetenskap. Afd. Natuurk. Derde Reeks. 9<sup>de</sup> Deel 1 Stuk 1891. S. 73.

Vielleicht ~~darf~~ man im Zusammenhang hiermit an die von Arthus und Pagès ~~gefundene~~ Thatsache erinnern, dass Anwesenheit oder Hinzufügung von ~~Casein~~ das Ausfallen des gebildeten Paracaseins hintanhält.

Wie also das Blut eine labhemmende Wirkung ~~ausübt~~, so kann ein Bestandtheil der Milch die Blutgerinnung aufheben.

Die eigenthümliche Einwirkung des Pseudoglobulins auf die Labgerinnung, seine Function als *normales* «Antilab» möchten wir demnach zurückführen auf das specifische Verhalten des Eiweisskörpers zu Calciumsalzen, mit denen derselbe eine Verbindung eingeht, welche zwar in Wasser löslich, aber relativ wenig dissociirt ist. Dass sie immerhin dissociirt sein muss, geht aus ihrer Reactionsfähigkeit gegen Oxalat hervor; denn aus solchen Lösungen von Pseudoglobulincalcium resp. citronensaurem Calcium, die mit Phosphaten und Carbonaten nicht reagiren, lässt sich das Calcium-Jon ( $\text{Ca}^+$ ) mit oxalsaurem Salz abscheiden.

Aehnliches gilt auch für das Caseincalcium.

Ohne die vorhandenen physikalisch-chemischen Analogien anführen zu wollen, in denen eine ähnliche Scala der Affinitäten zu Tage tritt (als eine von der Acidität, wie es scheint, unabhängige steigende Selection bestimmter Säuren für die Bindung des Calciums oder einer anderen Base) möchten wir nur auf eine physiologisch-chemische Analogie hinweisen, welche wir wiederum O. Hammarsten und seinem Schüler Lundberg<sup>1)</sup> verdanken. Dieselben haben nämlich gezeigt, dass bei Neutralisation einer kalkhaltigen Caseinlösung mit Phosphorsäure oder Kohlensäure eine mit Lab gerinnende Flüssigkeit erhalten werden kann. Wurde jedoch zur Neutralisation Oxalsäure verwendet, so blieb die Gerinnung aus. Es ist also nicht die Wasserlöslichkeit des mit Casein zusammengebrachten Calciumsalzes, sondern die Natur der Bindung der für die Käsebildung wesentliche Factor.

---

<sup>1)</sup> Upsala Läkare förenings förhandlingar, Bd. 11, S. 843. Ein Referat von Hammarsten siehe Maly's Jahresbericht, Bd. VI, S. 11, 1876.

## Ueber den Phosphor der Nucleinstoffe.

Von  
**Alberto Ascoli.**

---

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)  
(Der Redaction zugegangen am 21. Oktober 1900.)

---

In einer früheren Abhandlung habe ich erwiesen, dass die « Plasminsäure », ein von A. Kossel aus der Hefe dargestelltes phosphorreiches Produkt, sich aus verschiedenen Bestandtheilen zusammensetzt, unter denen Hefenucleinsäure und Metaphosphorsäure nachgewiesen werden können. Dieses Ergebniss legt den Gedanken nahe, die Bindungsweise des Phosphors in den Nucleinsäuren mit den von mir benutzten Methoden einer erneuten Untersuchung zu unterwerfen, um festzustellen, ob nicht auch hier die Metaphosphorsäure nachweisbar ist. Diese Frage musste sich nach meinen Untersuchungen um so mehr aufdrängen, da bekanntlich die Vermuthung, dass die Nucleinstoffe als Metaphosphorsäure-Derivate aufzunehmen seien, in der Litteratur bereits eine gewisse Rolle <sup>1)</sup> gespielt hat.

Ich habe bei meinen Untersuchungen folgenden Plan verfolgt:

---

1) Siehe hierüber Liebermann, Pflüger's Archiv, Bd. 43 u. 47; Ber. d. deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 21; Centralbl. f. d. mediz. Wissenschaften 1889; Pohl, Diese Zeitschrift, Bd. XIII; Malfatti, Diese Zeitschrift, Bd. XVI u. XVII; Altmann, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtheilung 1889; Kossel, Arch. f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abtheilung 1893; Salkowski u. Hahn, Pflüger's Archiv, Bd. 59; Giertz, Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII.

Das Nuclein oder das Paranuclein resp. seine Muttersubstanz wird mit kalten concentrirten Laugen gespalten; diese Zersetzung ist so weitgehend, dass die phosphorhaltige Gruppe abgespalten wird und in der Flüssigkeit sogar Orthophosphorsäure nachzuweisen ist; entsteht nun bei der Spaltung eine Metaphosphorsäure — und sie wird dann abgespalten werden, wenn sie in dem Molekül der Muttersubstanz vorhanden war —, dann muss sie, zumal die Umwandlungsgeschwindigkeit der Metaphosphorsäure durch kalte Laugen keineswegs eine rapide ist,<sup>1)</sup> nach der Methode, welche sich bei der Hefe so gut bewährt hat, auch nachgewiesen werden können. Der Gang der Untersuchung ist demnach folgender: es wird das Nuclein resp. das Paranuclein durch Einwirkung einer concentrirten (20—30% igen) Natronlauge 15—30 Minuten lang gespalten; hierauf wird die Lösung mit Wasser verdünnt und mit so viel Eisenchlorid gefällt, dass die Flüssigkeit zu einem nicht allzu dicken, aber doch gut filtrirbaren Brei wird; dieser wird durch Spitzbeutel filtrirt und in dem Filtrate durch Fällern mit salzsaurem Alkohol und weitere Behandlung, wie bei der Darstellung der Plasminsäure, nach der Anwesenheit eines solchen Complexes gefahndet. Es muss natürlich die Menge des in Anwendung kommenden Ausgangsmaterials eine grosse sein, da ja die Ausbeute nach meinen Erfahrungen über die Plasminsäure keine reichliche ist; und es muss die Menge eine um so grössere sein, je phosphorärmer das Ausgangsmaterial.

Meine Untersuchungen erstreckten sich bis jetzt nur auf je ein Glied der beiden zu studirenden Klassen: und zwar habe ich von den echten Nucleinen das Leukonuclein, von den Nucleoalbuminen, den Muttersubstanzen der Paranucleine, das Casein in der oben beschriebenen Weise behandelt; vom Leukonuclein kamen bei seinem Phosphorgehalte von etwa 5% 350 g zur Verarbeitung, während von dem phosphorarmen Casein einmal 2 kg, das andere Mal 500 g verarbeitet wurden.

---

<sup>1)</sup> Paul Sabatier, Sur la vitesse de transformation de l'acide métaphosphorique, Annales de Chimie et Physique, VI. S., T. 18, 1889



300 g. Nucleinsäure, welches mit dem Professor Kessler freundlichst zur Verfügung stellte, wurden in 1 Liter Wasser aufgeschwemmt und durch allmählichen Zusatz von 2 Litern einer 45%igen Lösung von Aetznatron unter kräftigem Umrühren zur Lösung gebracht; nach etwa 15 Minuten wurde die Flüssigkeit mit 3 Liter Wasser verdünnt, mit circa 2 Liter einer 48%igen Eisenchloridlösung versetzt und der entstandene Brei auf Spitzbeutel gebracht. Das klare hellgelbe Filtrat, welches etwa 4 Liter betrug, wurde mit dem anderthalbfachen Volumen einer Mischung von concentrirter Salzsäure und 85%igem Alkohol gefällt; die Salzsäuremenge war durch Titration einer Portion des Filtrates ermittelt und genügte eben, um die alkalische Reaction des Filtrates in eine schwach saure umzuwandeln. Nachdem sich der entstandene Niederschlag abgesetzt hatte, wurde die darüberstehende Flüssigkeit abgehebert, der Niederschlag auf einem Faltenfilter gesammelt und durch systematische Behandlung mit Alkohol und Aether getrocknet. Die so gewonnene Substanz wog trocken 43 g. Sie wurde mehrmals mit Wasser extrahirt und die filtrirten Extracte durch salzsauren Alkohol gefällt. Die Ausbeute an diesem Produkt betrug etwas über 3 g; die Substanz war löslich in Wasser, die wässrige Lösung reagirte sauer und die Analyse charakterisirte sie als eine Nucleinsäure mit 9,49% P.

0,1968 g, derselben bei 90° getrocknet, mit Soda und Salpeter verascht gaben nach der Molybdänmethode 0,06709 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ .

Es war nicht möglich, auf den bei der Plasminsäuregewinnung zur Anwendung gekommenen Wegen daraus ein phosphorreicherer Präparat zu gewinnen. Etwa 2 g dieser Nucleinsäure in Wasser gelöst und mit  $\text{NH}_3$  neutralisirt wurden mit überschüssiger Strychninchloridlösung versetzt; es entstand, genau so wie bei anderen von mir untersuchten Nucleinsäuren, nur eine geringe milchige Trübung, die sich in Eiskühlung als klebriger Wand- und Bodenbesatz ausschied, der auf keine Weise zur Krystallisation gebracht werden kann. Der für die Plasminsäure so charakteristische Atomcomplex,

der bei derselben Behandlung so leicht und schön krystallisierte, war also nicht vorhanden. Es enthielt mithin das Leukonuclein keinen in Form von Metaphosphorsäure gebundenen Phosphor.

## II. Untersuchung des Caseins.

2 kg Caseinum siccum des Handels (von Dr. Grübler bezogen) wurden mit 3 Liter 30%iger Natronlauge versetzt, wodurch die gut durchgeknetete Masse zum Quellen gebracht wurde; nach etwa  $\frac{1}{4}$  Stunde wurde die Gallerte mit  $4\frac{1}{2}$  Liter Wasser verdünnt und wiederum gut durchgeknetet, sodass sie sich zum grösseren Theile löste, hierauf das Ganze mit etwa 2 Liter 48%iger Eisenchloridlösung gefällt und der entstandene Brei auf Spitzbeutel gebracht. Am nächsten Morgen wurde das dickflüssige klare Filtrat mit dem gleichen Volumen einer Mischung von concentrirter Salzsäure und 90%igem Alkohol gefällt, nachdem die nöthige Salzsäuremenge in üblicher Weise durch Titration einer Portion bestimmt worden war. Der entstandene Niederschlag war phosphorhaltig, aber es gelang nicht, daraus durch eine verdünnte (0,8%ige) Salzsäure einen durch salzsauren Alkohol fällbaren, also der Plasminsäure analogen Körper zu gewinnen; noch gaben die neutralisirten Extracte einen Niederschlag mit Strychninchlorid.

Um die durch die Bildung von Alkalialbuminat entstehende Quellung des Caseins zu verhindern, stellte ich mit dem Casein noch einen zweiten Versuch an, wobei ich folgenden Weg einschlug: 500 g des obigen Caseins wurden einer Verdauung mit 2500 ccm. Pepsinsalzsäurelösung im Brutschrank so lange unterworfen, bis beim Versetzen einer Probe der Verdauungsflüssigkeit mit starker Natronlauge keine Gallertbildung mehr stattfand. Als dies eingetreten, wurde die Verdauungsflüssigkeit mit 2 Litern einer 45%igen Natronlauge versetzt, sodass die Mischung einen Gehalt von 20% an Aetznatron aufwies; es bildete sich keine Gallerte. Nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde wurde die Lösung mit 4 Liter Wasser verdünnt und mit ca. 2 Liter einer 48%igen Eisenchloridlösung versetzt, der entstandene Brei auf Spitzbeutel gebracht. Das klare gelbliche Filtrat gab

wesenheit des gesuchten Complexes ebenso wie in dem vorigen Versuche bewiesen war.

Aus meinen bisherigen Untersuchungen ergibt sich also, dass weder aus dem Leukonuclein noch aus dem Casein ein zur Gruppe der Metaphosphorsäuren gehöriger Atomcomplex entsteht, wie er aus der Hefezelle zu gewinnen ist. Das Paranuclein aus Casein kann also schon deshalb nicht als eine Verbindung von Eiweiss mit Metaphosphorsäure angesehen werden, weil es überhaupt keine Metaphosphorsäure enthält; und dasselbe gilt für das Leukonuclein. Andererseits ist es aber nicht gestattet, die bis jetzt gewonnenen Resultate zu verallgemeinern und auf alle Nucleinstoffe auszudehnen. Wir sind nämlich im Laufe des letzten Jahrzehntes so gewaltige Unterschiede im Baue der Nucleine gewärtig geworden, dass wir keineswegs berechtigt sind, die Bindungsweise des Phosphors in den Nucleinsäuren im Vorhinein als eine gleichartige anzusehen; und auch für die Paranucleine sind schon grundlegende Verschiedenheiten aufgefunden worden, wie das Vorkommen einer Kohlenhydratgruppe in den einen<sup>1)</sup>, die den andern fehlt, sodass wir uns auch bei diesen vor einer Verallgemeinerung unserer Ergebnisse hüten müssen.

Es sind also zur Lösung der uns vorgelegten Frage weitere Untersuchungen nothwendig, die sich auf die verschiedenartigsten Nucleine und Paranucleine erstrecken sollen. Die Schwierigkeiten, welche die unumgängliche Beschaffung grösserer Mengen Ausgangsmaterial bieten wird, werden hoffentlich keine unüberwindlichen sein. Es wird weiterhin geboten sein, sich über das Vorkommen des in der Hefezelle nachgewiesenen eigenthümlichen, zu den Metaphosphorsäuren gehörigen Complexes, auch in thierischen Zellen zu orientiren. Beides soll weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

---

<sup>1)</sup> Walter, Zur Kenntniss des Ichthulins und seiner Spaltungsprodukte, Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 447; siehe auch Hammarsten, Archiv f. d. ges. Physiologie, Bd. 36, S. 440.

# Ueber ein neues Spaltungsprodukt des Hefenucleins.

Von

Alberto Ascoli.

---

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 2. October 1900.)

---

Das Thymin, von A. Kossel und A. Neumann,<sup>1)</sup> unter den Spaltungsprodukten der Thymusnucleinsäure aufgefunden, wurde von denselben auch aus Milznucleinsäure, von Miescher aus Lachssperma, von Kossel aus Störsperma, von Gulewitsch aus Heringstestikeln gewonnen. Aus der Hefenucleinsäure wurde zwar von A. Kossel und A. Neumann<sup>2)</sup> eine Substanz isolirt, welche in ihren Reactionen mit dem Thymin übereinstimmte, doch reichte die erhaltene Menge zu einer Analyse nicht aus.

Im verflorbenen Frühjahr nahm ich nun, einer Anregung des Herrn Professor Kossel folgend, die Frage, ob aus Hefenuclein Thymin abzuspalten sei, wieder auf. In der Zwischenzeit ist nämlich durch die von Jones ausgearbeitete Methode<sup>3)</sup> die Gewinnung des Thymins wesentlich erleichtert worden; und auch mir gelang es unschwer, aus Thymusnuclein, nach einer sich im Wesentlichen mit der Jones'schen deckenden Methode<sup>4)</sup> grössere Mengen ganz reinen Thymins darzustellen,

---

1) Berl. Ber., Bd. XXVI, S. 2754.

2) A. Kossel und A. Neumann, Ber. d. deutsch. ch. Ges., Bd. XXVII, S. 2217, sowie Sitzungsberichte der kgl. preuss. Akad. der Wiss. zu Berlin 1894, 18.

3) Walter Jones, Ueber die Darstellung des Thymins. Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 461.

4) Mein Verfahren wich von dem Jones'schen nur insofern ab, als ich zum Ansäuern der durch Baryumhydroxyd alkalischen Flüssigkeit statt Salpetersäure Schwefelsäure anwendete und weiterhin die von ihm als B und C bezeichneten Niederschläge vereint verarbeitete. Auf je 200 g Nuclein kamen zur Spaltung 1 Liter 20 volumprocentiger Schwefelsäure.

zersetzt sublimirte, gegen Silbernitrat und Ammoniak sich in bekannter Weise verhielt und auch bei der Molekulargewichtsbestimmung nach der Siedemethode die erfordernten Werthe gab: gefunden wurde die Zahl 129, während die Theorie für  $C_5H_7N_3O_2$  126 erfordert.

Die Molekulargewichtsbestimmung wurde an der bei  $110^\circ$  getrockneten Substanz mit Hilfe der Siedemethode in wässriger Lösung ausgeführt.

g	A	M
2,1655%	0,087°	129
2,2370%	0,090°	129

M (für  $C_5H_7N_3O_2$  berechnet) 126.

Anders das nach derselben Methode gewonnene Produkt aus Hefenuclein; zwar verhielt es sich gegen Silbernitrat ähnlich wie Thymin und wurde, ebensowenig wie dieses, durch Phosphorwolframsäure gefällt, aber es krystallisirte fast ausschliesslich in rosettenförmig angeordneten Nadeln und sublimirte nicht so leicht unzersetzt wie das Thymin; während dieses einem fettigen, seideglänzenden, lockeren Filzwerk ähnlich sieht, bildet die Substanz aus Hefe ein weisses krystallinisches Pulver; beim vorsichtigen Erhitzen zwischen zwei Uhrgläsern oder unter einem Trichter sublimirt es nur theilweise unzersetzt, zum anderen Theile entwickelt es rothe Dämpfe, die sich am oberen Uhrglas oder auf dem Trichter zu einem gummiartigen rothen Belage verdichten, und es verkohlt sehr leicht. Alle Versuche durch fractionirte Fällung mit Silbernitrat und Ammoniak, durch Umkrystallisiren aus Wasser, Säuren und Alkalien oder durch Sublimation Thymin zu erhalten, blieben erfolglos. Es gaben vielmehr die Analysen zweier verschiedener Krystallisationen desselben mehrfach aus verdünnter Salzsäure umkrystallisirten Präparates, sowie die eines anderen von einer

1) Wl. Gulewitsch. Ueber das Thymin. Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 292.

zweiten Darstellung stammenden und vielfach aus verdünnter Schwefelsäure, verdünnter Salzsäure, Ammoniak und Wasser umkrystallisirten Produktes Zahlen, welche, mit Rücksicht auf die Molekulargewichtsbestimmung, zu der Formel  $C_4H_4N_2O_2$  führen.

	Berechnet für $C_4H_4N_2O_2$	Gefunden		
		Präparat A.	Präparat B.	
		I. Kryst.	II. Kryst.	
C %	42,82	43,01	43,20	43,25
H %	3,59	3,68	3,72	3,55
N %	25,05		24,87	24,90

Die analysirten Substanzen waren alle bei 100° zur Gewichtsconstanz gewogen und aschefrei.

AI 0,1472 g gaben 0,2321 g  $CO_2$  und 0,0484 g  $H_2O$ .

AII 0,1360 g gaben 0,2154 g  $CO_2$  und 0,0453 g  $H_2O$ .

AII 0,1109 g sättigten ab 19,7 ccm.  $\frac{N}{10}$  Oxalsäure.

B 0,1320 g gaben 0,2093  $CO_2$  und 0,0419  $H_2O$ .

B 0,2190 g lieferten 47,9 ccm. feuchten N (19°; 748 mm. Bar.)

Eine Molekulargewichtsbestimmung nach der Siedemethode ergab die Zahl 110; berechnet ist für  $C_4H_4N_2O_2$  112.

Der Apparat war derselbe, in dem die Molekulargewichtsbestimmung des Thymins stattgefunden hatte; als Lösungsmittel diente ebenfalls Wasser; die Substanz war bei 100° getrocknet:

$$g = 3,5695\% \quad A = 0,169\% \quad MG = 110$$

$$\text{Berechnet} = 112.$$

Das geringe Plus an Kohlenstoff und Minus an Stickstoff dürfte auf eine kleine Verunreinigung mit Thymin zurückzuführen sein, worauf auch die mikroskopisch nachweisbare Anwesenheit einzelner an Thymin erinnernder Krystalle hinweist. Die Substanz ist in heissem Wasser leicht, in kaltem ziemlich schwer löslich, fast unlöslich in Alkohol und Aether; leicht löslich in Ammoniak; sie bildet keine Verbindungen mit Salzsäure noch mit Salpetersäure; aus wässriger Lösung wird sie durch Quecksilbernitrat niedergeschlagen.

Es besitzt demnach der vorliegende Körper eine empirische Formel, welche der des Uracils entspricht. Das Uracil ist bisher noch nicht dargestellt worden. Es gibt verschiedene Gründe, welche den Gedanken nahe legen, dass es sich hier

um Uracil handelt. Vor Allem die Thatsache, dass die Nucleinsäuren die Ursprungsstätten anderer Pyrimidinderivate, nämlich der «Alloxurbasen» oder «Purinderivate» sind.<sup>1)</sup>

Der Beweis, dass das vorliegende Produkt Uracil ist, wird erbracht sein, wenn es gelingt, durch Einführung einer Methylgruppe zum Methyluracil oder vielleicht gar zum Thymin zu gelangen.

Auf diesen Voraussetzungen sollen die weiteren Untersuchungen über die Constitution der vorliegenden Substanz fassen, die ich nach Beschaffung des nothwendigen Materials vorzunehmen gedenke.

Es sei mir zum Schlusse gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Kossel, meinen innigsten Dank auszusprechen für sein nie versiegendes Interesse an meinen Forschungen und seine unerschöpfliche Bereitwilligkeit, mir jederzeit mit Rath und That zu helfen; wie oft wäre ich sonst entmuthigt den sich vor mir aufthürmenden Schwierigkeiten machtlos gegenübergestanden!

---

<sup>1)</sup> Nach Abschluss dieser Arbeit hat Herr Dr. Steudel einen Beweis für die Zugehörigkeit zu den Pyrimidinderivaten erbracht, nämlich die Thatsache, dass sowohl das Thymin, wie auch der von mir gefundene Körper unter geeigneten Bedingungen die Alloxanreaction geben.

## **Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper.**

Von

**A. Kossel und F. Kutscher.**

---

Die Elementaranalyse, deren Ergebnisse bei den einfacheren organischen Verbindungen die Grundlage für die Erforschung der Constitution liefert, kann bei den Eiweisskörpern nur wenig zur Aufklärung ihrer chemischen Structur beitragen. Sie gibt nur geringe Anhaltspunkte für die Unterscheidung der einzelnen Eiweissstoffe unter einander oder für die Aufstellung eines Systems dieser complicirten Verbindungen. Wir kennen die Molekulargrösse der Eiweissstoffe nicht, aber selbst wenn wir das denkbar geringste Molekulargewicht und die denkbar einfachste Elementarformel derselben unserer Betrachtung zu Grunde legen, so ist doch die Anzahl der Atome in dem Molekül eine so bedeutende, dass die Anzahl der möglichen Combinationen zwischen diesen Atomen über alle Maasse gross ist. Diese Formeln geben also der Constitutionsforschung nur geringe Anhaltspunkte.

Für den Zweck dieser Forschung wird eine andere Art der Untersuchung an die Stelle der Elementaranalyse treten müssen, welche nicht mit den Atomen, sondern mit Atomgruppen rechnet. Die Zerlegung der Eiweisskörper durch siedende verdünnte Mineralsäuren liefert gut definirte Spaltungsprodukte und verläuft hinreichend glatt, um die Untersuchung der quantitativen Verhältnisse zwischen den hydrolytischen Zersetzungsprodukten zu ermöglichen. Die so gewonnene Aufklärung über die quantitativen Verhältnisse, die zwischen den grösseren Bruchstücken des Eiweissmoleküls obwalten, wird einen besseren Einblick in die Structur des



selbst wenn sie sicher festgestellt ist. Wenn die quantitativen Beziehungen zwischen den « Spaltungsproducten » der Eiweisskörper bekannt sind, so hat die Eiweisschemie weiterhin die räumliche Vertheilung dieser Atomgruppen nach denselben Principien zu untersuchen, nach welchen die Structurchemie die Lagerung der Atome festzustellen pflegt.

Unsere Untersuchungen beschäftigen sich mit einer bestimmten Gruppe von Spaltungsproducten der Eiweisskörper, nämlich mit den Hexonbasen. Wir haben zunächst Methoden ausgearbeitet, um diese Körper in sicherer Weise quantitativ aus dem Gemisch der Zersetzungsprodukte zu gewinnen, und weiterhin diese Methoden an einigen Eiweisskörpern durchgeführt. Wir betrachten die Bestimmung der Hexonbasen als die Grundlage aller dieser quantitativen Untersuchungen über die Eiweisskörper, weil sich bei dieser Betrachtungsweise ein chemisches System der Eiweisskörper aufbauen lässt, in welchem man von einfacheren Stoffen, den Protaminen, ausgehend stufenweise zu den complicirteren Gliedern der Eiweissgruppe gelangt.

#### *A. Untersuchungsmethoden.*

Die bei der Untersuchung in Betracht kommenden Operationen sind folgende:

I. Zersetzung der Eiweisskörper mit Hülfe von Schwefelsäure bei Siedetemperatur.

II. Entfernung der Schwefelsäure gleichzeitig mit den bei der Zersetzung gebildeten Huminstoffen durch Baryt. Bestimmung des « Humin-Stickstoffs ».

Bestimmung und Entfernung des Ammoniaks durch Magnesia.

III. Fällung von Arginin und Histidin als Silberverbindungen.

IV. Quantitative Bestimmung des Histidins.

V. Quantitative Bestimmung des Arginins.

VI. Quantitative Bestimmung des Lysins.

Wir haben die Mengen der zu untersuchenden Eiweiss-

körper so gross genommen, dass eine genauere Untersuchung der in krystallisirtem Zustand dargestellten Zersetzungsprodukte möglich war und dass die in Lösung bleibenden Antheile der Silber- und Phosphorwolframsäureniederschläge einen möglichst geringen Bruchtheil des Ganzen ausmachten. Nur auf diese Weise kann man sich bei solchen Untersuchungen vor groben Täuschungen bewahren. Beim Histidin ergaben sich in einigen Fällen Zweifel über die chemische Natur des von uns dargestellten Produkts (s. Analyse des Hists).

Wir bemerken ausdrücklich, dass diese Methoden noch nicht als abgeschlossene gelten können und dass wir mit der Vervollkommnung derselben beschäftigt sind.

#### **I. Zersetzung der Eiweisskörper durch Schwefelsäure.**

Die Menge der für die Untersuchung verwendeten Substanz richtete sich nach dem zu erwartenden Gehalt an Hexonbasen. Bei den einfachsten Protaminen, z. B. dem Clupein, genügen 2—5 g, bei den basenarmen Eiweisskörpern haben wir 40—50 g verwendet, bei den übrigen dazwischenliegende Menge.

Als Spaltungsmittel wählten wir Schwefelsäure. Nachdem durch die Untersuchungen von F. Kutscher<sup>1)</sup> die verschiedenartige Wirkung von Schwefelsäure und Salzsäure in Bezug auf die Bildung der Glutaminsäure aus Casein festgestellt worden war, durfte man nicht ohne Weiteres voraussetzen, dass die höchste Ausbeute an Hexonbasen durch Einwirkung der Schwefelsäure zu erzielen war. Wir stellten deshalb vergleichende Versuche mit anderen Säuren, insbesondere mit Jodwasserstoffsäure (bei Gegenwart von phosphoriger Säure), an, erhielten jedoch auf diese Weise durch die Halogenwasserstoffsäure keine höheren Werthe.

Als Beispiel möge die folgende Zusammenstellung dienen:  
Spaltung des Glutencaseins durch:

- A) siedende Jodwasserstoffsäure bei Gegenwart von phosphoriger Säure, 12 Stunden,
- B) siedende stärkere Schwefelsäure, 12 Stunden,
- C) siedende schwächere Schwefelsäure, 8 Stunden.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift Bd. XXVIII, S. 123.

Histidin	0,9	0,76	1,56
Arginin	4,45	4,2	4,5
Lysin	1,84	2,29	2,0

Die Resultate der Spaltung mit Halogenwasserstoff waren hier also annähernd die gleichen, wie die durch Schwefelsäure erzielten, ebenso bewirkte die Concentration der Schwefelsäure keinen Unterschied. Diese Resultate beweisen, dass die Spaltung in allen Fällen eine vollständige war.

Die Zersetzung der Eiweisskörper gestaltete sich hiernach folgendermassen :

I. 25—50 g der zu untersuchenden Eiweisssubstanz werden mit einer Mischung von dem dreifachen Gewicht concentrirter Schwefelsäure und dem sechsfachen Gewicht Wasser 14 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Flüssigkeit wird sodann auf 1 Liter aufgefüllt, genau 5 oder 10 ccm. abgemessen und nach Kjeldahl zur Bestimmung des Stickstoffs verwendet.<sup>1)</sup> Aus dem Stickstoffgehalt der Flüssigkeit wird die dem Versuch unterworfenen Eiweissmenge berechnet. In solchen Fällen, wo der Stickstoffgehalt des zersetzten Körpers nicht genau bekannt ist, wird derselbe in einem besonderen Versuch nach Kjeldahl festgestellt.

## II. Entfernung der Schwefelsäure. «Huminstickstoff».

Wie Mulder<sup>2)</sup> zuerst angegeben hat, bilden sich bei der Einwirkung der Mineralsäuren auf Eiweisssubstanz huminartige Stoffe; das Gemisch dieser in ihren chemischen Beziehungen noch wenig bekannten Stoffe wird neuerdings als «Melanoidinsäure» bezeichnet<sup>3)</sup>.

Diese Stoffe werden durch Baryt grösstentheils niedergeschlagen; wenn man also die Schwefelsäure, welche zur Zerlegung der Eiweissstoffe gedient hat, mit Baryt abstumpft,

---

1) Alle im Laufe dieser Untersuchungen vorkommenden Kjeldahl-Bestimmungen wurden doppelt ausgeführt.

2) Journal für praktische Chemie Bd. 21 (1840), S. 343.

3) Schmiedeberg, Ueber die Elementarformeln einiger Eiweisskörper u. s. w. Archiv f. exp. Pathologie Bd. 39, S. 65.

so enthält das Baryumsulfat eine gewisse Menge durch siedendes Wasser nicht extrahirbarer Stoffe. Ebenso muss auch die Magnesia, welche zur Austreibung des Ammoniaks hinzugefügt wird, einen Theil dieser humusartigen Stoffe aufnehmen. Wir bezeichnen den Stickstoff der im Baryt- und Magnesianiederschlag zurückbleibenden Stoffe als «Huminstickstoff». Mit dieser Bezeichnung wollen wir nichts über das Verhältniss der in Baryt- und Magnesianiederschlägen zurückbleibenden Stoffe zu der von Schmiedeberg als «Melanoidinsäure» analysirten Substanz aussagen. Ebenso wenig haben wir Untersuchungen darüber angestellt, inwiefern die Ausfällung dieser huminartigen Stoffe durch Baryt und Magnesia eine vollständige ist; vielmehr betrachten wir die gewonnenen Zahlen lediglich als Minimalwerthe.

Die weitere Verarbeitung der in I gewonnenen Flüssigkeit war demnach folgende.

II. Die schwefelsaure Lösung wird mit einer heissen concentrirten Barytlösung versetzt, bis die Reaction nur noch schwach sauer und fast die ganze Menge der Schwefelsäure ausgefällt war. Der schwefelsaure Baryt wird auf der Nutsche abgesaugt, dreimal mit Wasser ausgekocht, jedesmal abgenutscht und mit heissem Wasser nachgewaschen. Filtrate und Waschwasser werden vereinigt, eingedampft und die Flüssigkeit genau auf 1 Liter aufgefüllt. Von dieser Lösung werden je 5 oder 10 ccm. für die Kjeldahl-Bestimmung entnommen. Diese ergibt die Menge des im Barytniederschlag zurückgebliebenen Stickstoffs, also des «Huminstickstoffs I».

Von derselben Flüssigkeit werden zweimal je 100 ccm. zur Bestimmung des Ammoniaks mit Magnesia destillirt. Der Rest der Flüssigkeit wird in einer grossen Schale bis zur völligen Vertreibung des Ammoniaks mit Magnesia auf dem Wasserbade erhitzt. Die drei vereinigten Flüssigkeiten werden mit Barytwasser bis zur stark alkalischen Reaction versetzt, der entstandene Niederschlag abgesaugt und durch dreimaliges Auskochen mit Wasser, Absaugen und Auswaschen gereinigt. Die vereinigten Filtrate werden mit Schwefelsäure zur Entfernung des Baryts angesäuert, das

Filtrat und Waschwasser eingedampft und die eingeeengte Flüssigkeit auf 1 Liter aufgefüllt. Je 5 oder 10 ccm. dieser Flüssigkeit dienen zu einer Kjeldahl-Bestimmung. Aus dieser Bestimmung erfährt man unter Berücksichtigung des Resultates der Ammoniakbestimmung die Menge des im alkalischen Barytmagnesianiederschlag zurückgebliebenen Stickstoffs, also des «Huminstickstoffs II».

### III. Fällung von Arginin und Histidin als Silberverbindungen.

Diese Fällung wurde nach dem früher von A. Kossel angegebenen Verfahren<sup>1)</sup> in folgender Weise ausgeführt.

III. Die schwefelsaure in II erhaltene Flüssigkeit wird in einen 5 Liter fassenden Kolben hineingebracht, auf 3 Liter aufgefüllt und auf dem Wasserbade erwärmt. Man fügt zu der heissen Flüssigkeit fein gepulvertes Silbersulfat, erwärmt weiter, indem man von Zeit zu Zeit umschwenkt und prüft, ob die Menge des zugesetzten Silbersalzes ausreicht. Diese Prüfung wird in folgender Weise bewirkt. In einem Uhrgläschen, welches auf dunkler Unterlage steht, befindet sich Barytwasser. Mit Hülfe eines Glasstabes lässt man vom Rande her einen Tropfen der zu prüfenden Flüssigkeit hinzufließen. Ist der entstehende Niederschlag weiss, so ist die Menge des Silbersulfats nicht ausreichend und man fügt entweder mehr Silbersulfat oder, falls dieses in ungelöstem Zustand am Boden des Gefässes bemerkbar ist, mehr Wasser hinzu und wiederholt die Prüfung nach einiger Zeit. Die Menge des gelösten Silbersulfats ist eine ausreichende, wenn das Barytwasser in der silberhaltigen Lösung eine gelbe Fällung erzeugt. Sobald dies erreicht ist, lässt man die Flüssigkeit auf etwa 40° erkalten, sättigt sie mit gepulvertem Aetzbaryt und saugt den entstandenen Niederschlag sogleich auf der Nutsche ab. Man nimmt sodann den Niederschlag vom Filter, reibt ihn mit Barytwasser an, saugt die Flüssigkeit nochmals ab und wäscht mit barythaltigem Wasser sorg-

---

1) Diese Zeitschrift Bd. XXII, S. 182, Bd. XXV, S. 177.

fältig aus. Der Niederschlag wird sodann nach IV und V, die Flüssigkeit nach VI behandelt.

#### IV. Bestimmung des Histidins.

A. Kossel hat bei seinen früheren Versuchen, welche zur Auffindung des Histidins führten,<sup>1)</sup> die Trennung dieses Körpers vom Arginin durch Quecksilberchlorid bewirkt. Diese Trennung ist eine unvollständige und wir haben bei den neueren Untersuchungen ein anderes Verfahren angewandt, welches auf folgendem Princip beruht. Fügt man zu einer sauren Lösung, die Arginin und Histidin und zugleich einen Ueberschuss von Silbernitrat enthält, vorsichtig Barytwasser hinzu, so fällt zuerst das Histidinsilber aus. Nachdem die Ausscheidung des Histidinsilbers beendet ist, wird durch weiteren vorsichtigen Zusatz von Baryt znnächst kein Niederschlag bewirkt, erst bei etwas stärkerem Barytüberschuss fällt das Argininsilber. Als Erkennungsmittel für die völlige Ausfällung des Histidins benutzten wir ammoniakalische Silbernitratlösung, welche nach Hedin<sup>2)</sup> einen unlöslichen Niederschlag von Histidinsilber ( $C_6H_7Ag_2N_3O_2$ ) gibt.

Das durch Baryt gefällte Histidinsilber enthält, wenn es aus complexen Eiweissstoffen dargestellt ist, noch Verunreinigungen durch Silbersalze organischer Säuren, welche sich durch das unten angegebene Verfahren leicht entfernen lassen. Das zum Schluss gewonnene Histidinchlorid krystallisirte vollständig. Es mögen einige Versuche folgen, welche die Brauchbarkeit vorstehender Methode erläutern.

I. 0,5 g Arginin und 0,1 g Histidin werden in 60 ccm. Wasser gelöst, durch Salpetersäure neutralisirt, mit der genügenden Menge von Silbernitrat versetzt (bis ein Tropfen des Gemenges sich in gesättigter Barytlösung sofort braun färbte) und so lange mit verdünnter Barytlösung gefällt, bis eine Probe mit ammoniakalischer Silberlösung keine Fällung mehr gab. Der entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Salzsäure zersetzt und die salzsaure Lösung zur Krystallisation eingedampft.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift Bd. XXV, S. 176.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift Bd. XXII, S. 194.

n. In Versuch 2 wurden 0,1 g Arginin und 0,1 g Histidin in 20 ccm. Wasser gelöst angewandt.

III. In Versuch 3 endlich kamen 0,2 g Arginin und 0,1 g Histidin in 30 ccm. Wasser gelöst zur Verwendung. Im Uebrigen wurde in Versuch 2 und 3 wie in Versuch 1 verfahren.

Es wurden gewonnen in Versuch 1:

0,16 g krystallinisches Histidindichlorid = 0,108 g freies Histidin,  
in Versuch 2:

0,153 g krystallinisches Histidindichlorid = 0,104 g freies Histidin,  
in Versuch 3:

0,1465 g krystallinisches Histidindichlorid = 0,0996 g freies Histidin.

Das Verfahren zur Bestimmung des Histidins war somit folgendes:

IV. Der in III erhaltene Silberniederschlag wird in schwefelsäurehaltigem Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, vom Schwefelsilber abfiltrirt und der Niederschlag des Schwefelsilbers, welcher zugleich schwefelsauren Baryt enthält, ausgekocht und mit heissem Wasser sorgfältig ausgewaschen. Die filtrirte saure Flüssigkeit wird zur Vertreibung des Schwefelwasserstoffs eingedampft und auf 1 Liter aufgefüllt. In je 20 ccm. dieser Flüssigkeit wird eine Kjeldahl-Bestimmung ausgeführt, welche die Menge des Stickstoffs der durch Silber und Baryt fällbaren Substanzen angibt.

Nach Ausführung der Kjeldahl-Bestimmungen wird die Flüssigkeit mit Barytwasser neutralisirt, sodann gelöstes Baryumnitrat hinzugefügt, so lange noch die Entstehung eines Niederschlages zu beobachten ist, filtrirt und der Niederschlag sorgfältig ausgewaschen. Die Flüssigkeit wird jetzt auf etwa 300 ccm. eingedampft und mit Silbernitratlösung versetzt, bis eine Tropfenprobe, in der oben beschriebenen Weise geprüft, mit Barytwasser eine Gelbfärbung ergibt. Darauf wird die silberhaltige Lösung mit Barytwasser nochmals genau neutralisirt. Zu der neutralen Flüssigkeit fügt man jetzt (am bequemsten geschieht dies aus einer Bürette) kleine Mengen Barytwasser hinzu, bis das Histidinsilber völlig ausgefällt ist. Man prüft die Lösung nach dem Zusatz einer kleinen Menge

Barytwasser auf Histidin, indem man das Absetzen des Niederschlages abwartet und von der klaren Flüssigkeit mit Hülfe einer Glasröhre eine kleine Probe zur Prüfung mit ammoniakalischer Silberlösung entnimmt. Entsteht beim Zusammenfließen beider Flüssigkeiten ein im Ueberschuss des Ammoniaks leicht löslicher Niederschlag, so ist noch Histidin vorhanden und man fügt weiterhin eine kleine Menge Barytwasser hinzu. Sobald die Ausfällung des Histidins beendet ist, filtrirt man den Niederschlag ab, nimmt ihn vom Filter, reibt ihn mit Wasser an und wäscht ihn sorgfältig aus. Filtrat und Waschwasser des Histidinsilbers werden nach V auf Arginin verarbeitet.

Der argininfreie Silberniederschlag wurde sodann mit schwefelsäurehaltigem Wasser angerieben, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, von Schwefelsilber abfiltrirt, der Niederschlag mit siedendem Wasser völlig erschöpft. In einzelnen Fällen wurden die vereinigten Filtrate und Waschwasser auf 1 Liter aufgefüllt und in 40 ccm. dieser Flüssigkeit der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt, um die Menge der etwa im Schwefelsilber zurückbleibenden stickstoffhaltigen Substanz zu ermitteln.

In allen Fällen wurde die Schwefelsäure mit Barytwasser und der überschüssige Baryt mit Kohlensäure entfernt, bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 10—20%iger Silbernitratlösung, der 1 Tropfen verdünnter Salpetersäure zugefügt ist, aufgenommen. Hierbei bleibt eine geringe Menge organischer Substanz, welche das Histidin bis jetzt begleitet hat, unlöslich zurück. Man saugt den Rückstand ab, wäscht mit Wasser aus, fällt aus dem Filtrat das Histidinsilber durch vorsichtigen Zusatz von verdünnter, ammoniakalischer Silbernitratlösung aus, filtrirt den Niederschlag ab, zersetzt denselben mit Salzsäure und bringt das beim Eindampfen in krystallisirtem Zustand zurückbleibende Histidindichlorid  $C_6H_9N_3O_2$ ,  $2HCl$  nach dem Trocknen im Vacuum bei  $40^\circ$  zur Wägung.

#### V. Bestimmung des Arginins.

Das Arginin wird aus dem Filtrat des Histidinsilbers in Form der Silberverbindung, welche nach den im hiesigen



Institut ausgeführten Analysen von Gulewitsch<sup>1)</sup> eine Mischung der Verbindungen  $C_6H_{12}Ag_2N_4O_8$ ,  $H_2O$  und  $C_6H_{11}Ag_3N_4O_8$ ,  $H_2O$  ist, ausgefällt. Das aus der Silberverbindung in Freiheit gesetzte Arginin ist in verschiedenen Fällen nach folgenden 4 Methoden bestimmt worden 1. durch eine Kjeldahl-Bestimmung im Sulfat, 2. durch polarimetrische Untersuchung des Nitrats bei Gegenwart überschüssiger Salpetersäure, 3. durch Wägung des neutralen Nitrats, 4. durch Wägung des sauren Nitrats. Die niedrigsten Werthe wurden meistens bei der polarimetrischen Bestimmung erhalten. Man könnte zur Erklärung dieser Thatsache annehmen, dass aus gewissen Eiweissarten das von F. Kutscher entdeckte<sup>2)</sup> inactive Arginin in geringer Menge entsteht oder dass ein kleiner Theil des activen Arginins durch die Wirkung der Schwefelsäure inactivirt wird, doch liegen hierüber keine sicheren Beobachtungen vor. Die höchsten Werthe sind bei der Wägung des sauren Nitrats erhalten worden, als die sichersten Werthe haben wir die durch Kjeldahl-Bestimmung des Sulfats und durch Wägung des neutralen Nitrats erhaltenen angesehen. Diese ergaben gute Uebereinstimmung und entsprachen Mittelwerthen. Die Bestimmung des Arginins war folgende:

V. Das Filtrat vom Histidinsilber wurde mit gepulvertem Aetzbaryt gesättigt, der entstandene Niederschlag mit Hülfe der Saugpumpe abgesogen, vom Filter genommen, nochmals mit Barytwasser angerieben und bis zum Verschwinden der Salpetersäurereaction ausgewaschen. Der Niederschlag wurde sodann mit schwefelsäurehaltigem Wasser angerieben, mit Schwefelwasserstoff zerlegt, filtrirt, das Schwefelsilber mehrfach ausgekocht und heiss ausgewaschen. Das eingedampfte mit dem Waschwasser vereinigte Filtrat wird sodann auf 1 Liter aufgefüllt, und in je 10 oder 20 ccm. dieser Flüssigkeit eine Kjeldahl-Bestimmung ausgeführt. Aus dieser Bestimmung ist das Arginin zu berechnen. Der Rest wird durch Baryt

---

<sup>1)</sup> Wl. Gulewitsch, Ueber das Arginin. Diese Zeitschrift Bd. XXVII, S. 202.

<sup>2)</sup> F. Kutscher, Ueber das Antipepton III. Diese Zeitschrift Bd. XXVIII, S. 90.

von der Schwefelsäure, durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit. Zur Bestimmung des Arginins als neutrales Nitrat neutralisirt man die Flüssigkeit mit Salpetersäure, dampft ein, trocknet bei gewöhnlicher Temperatur im Vacuum und wägt den Rückstand, den man als  $C_6H_{14}N_4O_3 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$  in Rechnung zieht. Zur polarimetrischen Bestimmung füllt man die Flüssigkeit unter Zusatz von Salpetersäure auf das den Polarisations-Röhren entsprechende Volumen auf und stellt den Drehungswinkel fest, aus welchem sich unter Zugrundelegung der von Gulewitsch<sup>1)</sup> bei der Untersuchung des sauren Argininnitrats für Arginin gefundenen Zahl  $(\alpha)_D = + 25,48$  das Arginin berechnen lässt.<sup>2)</sup> Durch Eindampfen dieser Lösung kann man das saure Argininnitrat erhalten, aus dem nach der Formel  $C_6H_{14}N_4O_3 \cdot 2HNO_3$  das Arginin zu berechnen ist.

Bei richtiger Ausführung dieser Operationen bildet das erhaltene Argininnitrat eine trockene, weisse Krystallmasse und enthält entweder gar keine Asche oder so geringe Spuren von Magnesia, dass daraus kein beachtenswerther Fehler hervorgeht.

Die Löslichkeit des Argininsilbers ist von Gulewitsch<sup>3)</sup> festgestellt worden. Man kann nach seiner Untersuchung für jedes Liter barythaltiger Flüssigkeit, aus welcher das Argininsilber ausgefällt worden ist, 0,036 g Arginin der gefundenen Zahl hinzuzählen.

## VI. Bestimmung des Lysins.

Das Lysin wird aus dem Filtrat von Arginin und Histidin durch Phosphorwolframsäure gefällt. Da dieser Niederschlag stets Monoamidosäuren, in einzelnen Fällen auch basische Zersetzungsprodukte (Diamidoessigsäure?) enthält, so kann sein Stickstoffgehalt nicht direkt auf Lysin bezogen werden. Das

<sup>1)</sup> l. c. S. 190.

<sup>2)</sup> In einem Falle (bei der Untersuchung des Leims) wurde die polarimetrische Untersuchung bei Gegenwart eines Ueberschusses von Schwefelsäure ausgeführt und hier die von Gulewitsch festgestellte Zahl  $(\alpha)_D = + 22,35$  der Berechnung zu Grunde gelegt.

<sup>3)</sup> l. c. S. 209.

Verfahren<sup>1)</sup> als Picrat ausgefällt und nach dem Umkrystallisiren aus Wasser als solches gewogen.

Durch besondere Versuche überzeugten wir uns davon, dass die Fällung des Lysins durch Phosphorwolframsäure auch bei Gegenwart von Monoamidosäuren eine hinreichend vollständige ist. Das Verfahren zur Bestimmung des Lysins ist folgendes :

VI. Das Filtrat von dem in III erhaltenen Silberniederschlag wird mit Schwefelsäure angesäuert, durch Schwefelwasserstoff von geringen Mengen Silber befreit, filtrirt, der das Schwefelsilber enthaltende Niederschlag mehrfach ausgekocht und heiss ausgewaschen.

In einzelnen Fällen wurde in dieser Flüssigkeit zunächst noch eine Kjeldahl-Bestimmung ausgeführt, um das völlige Auswaschen der Niederschläge zu kontrolliren. Wenn man die Resultate der ersten in IV ausgeführten und dieser Kjeldahl-Bestimmung vergleicht mit dem Stickstoffgehalt der vom Baryt-Magnesia-Niederschlag abfiltrirten Flüssigkeit, so kann man feststellen, ob in den beiden Silbersulfid und Baryumsulfat enthaltenden Niederschlägen (IV und VI) stickstoffhaltige Substanz zurückgeblieben ist.

In allen Fällen wurde die Flüssigkeit auf etwa 500 ccm. eingedampft, mit Schwefelsäure versetzt, bis der Procentgehalt 5%  $H_2SO_4$  betrug, und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Die Fällung wurde als beendet angesehen, wenn die vom Phosphorwolframsäureniederschlag abfiltrirte Flüssigkeit nach weiterem Zusatz von Phosphorwolframsäure noch 10 Sekunden klar blieb.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde mit Hülfe der Wasserstrahlpumpe abfiltrirt, sodann vom Filter genommen, mit 5%iger Schwefelsäure angerieben und sorgfältig ausgewaschen. Im Filtrat wurde eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ausgeführt, welche den grössten Theil des Stickstoffs

---

<sup>1)</sup> A. Kossel, Ueber die Darstellung und den Nachweis des Lysins. Diese Zeitschr. Bd. XXVI, Seite 586.

der Monoamidosäuren angibt<sup>1)</sup> neben dem Stickstoff etwa noch unbekannter, durch die vorhergehenden Fällungsmittel nicht gefällter Stoffe.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird sodann durch Aetzbaryt zerlegt, das unlösliche Baryumsalz abgesaugt, mehrfach ausgekocht und mit heissem Wasser ausgewaschen. Das mit den Waschwässern vereinigte Filtrat wird durch Kohlensäure vom Ueberschuss des Baryts befreit, bis fast zur Trockne eingedampft, mit Wasser aufgenommen,<sup>2)</sup> vom kohlensauren Baryt abfiltrirt und nochmals eingedampft. Der Rückstand wird jetzt mit einer geringen Menge alkoholischer Pikrinsäure unter Zusatz von Alkohol angerührt. Zu der alkoholischen Lösung setzt man in kleinen Portionen so lange alkoholische Pikrinsäure hinzu, als noch die Entstehung eines weiteren Niederschlages bemerkbar ist. Ein Ueberschuss an Pikrinsäure ist durchaus zu vermeiden, da durch diesen das Lysinpikrat wieder gelöst wird. Das ausgeschiedene Pikrat wird nach mehrstündigem Stehen abfiltrirt und mit einer möglichst geringen Menge absoluten Alkohols ausgewaschen, die alkoholische Mutterlauge wird für die weitere Verarbeitung eingedampft. Man löst jetzt das Lysinpikrat in siedendem Wasser, filtrirt nöthigenfalls heiss und dampft die Lösung auf ein geringes Volumen ein. Beim Erkalten scheidet sich das Lysinpikrat in nadelförmigen Krystallen aus, welche auf gewogenem Filter gesammelt, mit wenig Alkohol gewaschen und gewogen werden. Durch Eindampfen der Mutterlauge erhält man eine weitere Menge Lysinpikrat, die in gleicher Weise zur Wägung gebracht wird.

Da Lawrow<sup>3)</sup> festgestellt hat, dass 100 Theile Wasser bei 21—22° 0,54 g Lysinpikrat lösen, so kann man aus dem

---

<sup>1)</sup> Ein geringer Theil der Monoamidosäuren befindet sich im Phosphorwolframsäureniederschlag.

<sup>2)</sup> Bei einzelnen Versuchen wurde an dieser Stelle eine Kjeldahl-Bestimmung eingeschaltet, um das Verhältniss des Lysinstickstoffs zu dem Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe zu erfahren.

<sup>3)</sup> Lawrow, Ueber die Spaltungsprodukte des Histons von Leukocyten. Diese Zeitschrift. Bd. XXVIII, S. 398.

Volumen der Mutterlauge des Lysinikrats eine Correction für die gefundene Lysinmenge herleiten, die aber sicher etwas zu niedrige Zahlen ergeben wird. Zu besseren Resultaten gelangt man in folgender Weise <sup>1)</sup>: Die eingedampfte alkoholische Mutterlauge des Lysinikrats wird mit der wässerigen Mutterlauge vereinigt, mit Schwefelsäure angesäuert, durch Aether von Pikrinsäure befreit. Die ätherfreie Lösung wird sodann bei einem Schwefelsäuregehalt von 5% von Neuem mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags enthält Monoamidosäuren, die nach Entfernung der Phosphorwolframsäure auskrystallisiren; unter diesen ist Tyrosin durch Millon's Reagens nachweisbar. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wird ebenso wie vorher zerlegt, das darin enthaltene Lysin wie oben in Pikrat umgewandelt und die durch Wägung ermittelte Menge zu dem vorher gefundenen Pikrat hinzuaddirt. Aus dem Pikrat berechnet man das Lysin nach der Formel  $C_6H_{14}N_2O_3$ ,  $C_6H_5(NO_2)_3OH$ . Die gefundenen Zahlen werden noch immer zu niedrige sein, da das phosphorwolframsaure Lysin nicht ganz unlöslich ist. Doch ist dieser Fehler nicht bedeutend, weil die Menge des Lysins in allen Fällen eine erhebliche war und die Flüssigkeitsmenge 500 ccm. betrug. Ebenso gross war die Menge des Waschwassers.

#### Spaltung mit Jodwasserstoffsäure.

Wie schon oben erwähnt, haben wir die Spaltung der Eiweisskörper in einzelnen Fällen mit Jodwasserstoffsäure ausgeführt, um festzustellen, ob die mit Schwefelsäure erzielten Werthe der Hexonbasen die Maximalwerthe sind. Diese Spaltung ist analog der zuerst von Bopp <sup>2)</sup> angewendeten Spaltung durch concentrirte Chlorwasserstoffsäure. Um eine kräftige Reduction zu erzielen, liessen wir die Reaction bei Gegenwart von phosphoriger Säure vor sich gehen. Dies Verfahren ist in mancher Hinsicht einfacher und bequemer als die Spaltung

<sup>1)</sup> Dieses Verfahren kam bisher nur bei den Zersetzungsprodukten des Histons zur Ausführung.

<sup>2)</sup> Liebig's Annalen Bd. 69.

durch Schwefelsäure; es verläuft insofern anders, als die Menge des Ammoniakstickstoffs grösser ist, als bei der Spaltung durch Schwefelsäure. Ein weiterer Unterschied betraf das Chlorid des unter diesen Verhältnissen abgespaltenen Histidins, welches sich als optisch inactiv erwies. Wir haben übrigens diese Methode nicht in grösserem Umfang angewandt und wollen uns deshalb eines abschliessenden Urtheils über ihre Verwendbarkeit enthalten.

Die Ausführung ist folgende:

114 g Jod werden mit 14 g amorphen Phosphor und 86 ccm. Wasser angesetzt, Anfangs gekühlt und später erhitzt, bis die Flüssigkeit farblos war. Der überschüssige Phosphor wird sodann durch Glaswolle abfiltrirt. In diese Lösung bringt man etwa 50 g des Eiweisskörpers und erhitzt anfangs auf dem Wasserbade, später 12 Stunden im Paraffinbade am Rückflusskühler. Sodann wird die Flüssigkeit auf ein Liter aufgefüllt und wie oben nach Kjeldahl untersucht. Zur Entfernung der Jodwasserstoffsäure, der phosphorigen und der Phosphorsäure dient Bleiacetat, zur Entfernung des überschüssigen Bleis Schwefelwasserstoff. Auf das Auswaschen der Niederschläge wird wie oben die grösste Sorgfalt verwandt und im Filtrat durch eine Kjeldahl-Bestimmung die Menge des in den Niederschlägen verbleibenden «Huminstickstoffs» festgestellt.

Bevor man Magnesia zur Entfernung des Ammoniaks hinzufügt, entfernt man die Essigsäure durch mehrmaliges Eindampfen der Flüssigkeit und Wiederaufnehmen mit Wasser vollständig. Die weitere Verarbeitung der Flüssigkeit ist der oben beschriebenen gleich, nur ist zu berücksichtigen, dass eine sehr geringe Menge Jodwasserstoff der Fällung durch Blei entgeht. Man erhält also beim Zusatz des Silbersulfats einen nicht bedeutenden jodhaltigen Niederschlag, den man schon vor Ausfällung von Histidin und Argininsilber aus saurer Lösung abfiltrirt.

### *B. Untersuchung einzelner Eiweissstoffe.*

Die zur vollständigen quantitativen Untersuchung auf Hexonbasen verwendeten Eiweissstoffe sind folgende:

1. Salmin.
2. Clupein.
3. Sturin.
4. Cyclopterin.

## II. Gruppe der complicirten Eiweissstoffe.

1. Histon der Thymusdrüse.
2. Histon aus den Testikeln des Kabeljau.
3. Glutencasein.
4. Glutenfibrin.
5. Mucedin.
6. Gliadin.
7. Zein.

Unvollständige quantitative oder rein qualitative Untersuchungen wurden am Leim, am Spongine, Elastin, Casein der Kuhmilch, Eieralbumin und Fibrinpepton ausgeführt.

### 1. Salmin.

Wie A. Kossel früher nachgewiesen hat,<sup>1)</sup> entsteht bei der Spaltung des Salmins durch Schwefelsäure keine andere Hexonbase als Arginin. Neben dem Arginin ist ein stickstoffärmerer Rest vorhanden, der vermuthlich eine Monamidosäure enthält. Ammoniak entsteht bei dieser Spaltung nicht.<sup>2)</sup> Hier-nach ist die Bestimmung des bei dieser Spaltung entstehenden Arginins sehr einfach auszuführen.

2,5 g lufttrockenes Salminsulfat, welches nach dem früher von A. Kossel angegebenen Verfahren<sup>3)</sup> dargestellt worden war, wurden mit einer Mischung von 16 ccm. Wasser und 8 ccm. Schwefelsäure 8 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Analyse der Mischung ergab Folgendes:

a) Stickstoffgehalt der gesammten Flüssigkeit: 0,539 g. Daraus berechnet<sup>4)</sup> Menge des trockenen Salmins: 1,74 g.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 588.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 181.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 166.

<sup>4)</sup> Dieser Berechnung ist die von A. Kossel aufgestellte Formel des Salmins  $C_{30}H_{59}N_{17}O_7$  (diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 170) zu Grunde gelegt worden. Nach der Formel  $C_{16}H_{28}N_9O_3$  (Miescher-Schmiedeberg) würde sich ergeben 1,61 g Salmin.

ß) Stickstoffgehalt der durch Silbersulfat und Baryt fällbaren Bestandtheile, nach Zersetzung mit Schwefelwasserstoff im Filtrat vom Schwefelsilber bestimmt (s. oben, Untersuchungsmethoden III—V): 0,473 g. In diesem Falle war die Gesamtmenge des Stickstoffs auf Arginin zu beziehen, somit ergibt sich an Arginin: 1,465 g.

γ) Bestimmung der Versuchsfehler. Die Untersuchung der Flüssigkeit vor und nach Entstehung des ersten Barytniederschlags (s. oben Untersuchungsmethoden II) hat erwiesen, dass trotz der Auslaugung in dem Niederschlag 0,007 g Stickstoff zurückgeblieben ist.

Ebenso ergibt die Analyse der Flüssigkeit nach Entfernung des Silberbarytniederschlags, dass in diesem Niederschlag 0,006 g Stickstoff zurückgeblieben ist. Der Gesamtverlust beträgt somit 0,013 g Stickstoff oder 2,4% des gesammten Stickstoffs. Dieser Verlust kann nicht auf Arginin allein bezogen werden, betrifft vielmehr alle stickstoffhaltigen Bestandtheile der Lösung und ist, wie eine einfache Ueberlegung zeigt, so gering, dass er vernachlässigt werden kann.

Das Resultat der Argininbestimmung ist hiernach folgendes:

1,74 g Salmin ergaben 1,465 g, d. i. 84,3% Arginin. In 100 Theilen Stickstoff des Salmins sind 87,8 Theile in einer solchen Form enthalten, dass sie bei der hydrolytischen Spaltung als Arginin erscheinen. Am einfachsten würden sich die relativen Verhältnisse der Zersetzungsprodukte gestalten, wenn es möglich wäre, eine der älteren Formeln des Salmins mit 9 (oder 9n) Atomen Stickstoff, wie sie von Miescher aufgestellt worden sind, beizubehalten. Dann würde man zu der Annahme gelangen, dass auf je 2 Moleküle Arginin ein Atom Stickstoff in anderweitiger Bindung vorhanden sei. Doch ist diese Formel bisher nicht genügend begründet.

## 2. Clupein.

Das Clupein ist dem Salmin ausserordentlich ähnlich und A. Kossel<sup>1)</sup> sprach in einer früheren Abhandlung die Ansicht aus, dass beide identisch seien. Trotzdem wurden Salmin und Clupein von uns bezüglich der quantitativen Verhältnisse ihrer Spaltungsprodukte gesondert untersucht. Die früheren Arbeiten von A. Kossel<sup>2)</sup> haben gezeigt, dass bei der Spaltung des

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 173.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 590.



Clupeins nur eine Nebenbase, nämlich das Arginin, gewonnen und daneben Amidovaleriansäure. Ammoniak entsteht nicht.

Wir stellten drei Versuche an, von denen die beiden ersten den Zweck hatten, festzustellen, ob mit verschiedenen Fällungsmitteln das gleiche Resultat erzielt werde, während der dritte dazu diente, um festzustellen, ob die Einwirkung des Spaltungsmittels eine genügende sei, oder ob bei längerer Dauer der Einwirkung eine grössere Ausbeute an Arginin erzielt werde.

Im Versuch I wurde Phosphorwolframsäure, in II Silbersulfat und Baryt für die Fällung des Arginins benutzt. Bei der Fällung mit Phosphorwolframsäure ist zu beachten, dass die aus Clupein entstehende Amidovaleriansäure in concentrirter Flüssigkeit mit diesem Fällungsmittel einen krystallisirten Niederschlag gibt. Berücksichtigt man diese Thatsache nicht, so kann man sehr hohe Werthe für den Stickstoffgehalt des Phosphorwolframsäureniederschlags finden. A. Kossel erhielt bei seinen ersten im Jahre 1896 publicirten<sup>1)</sup> Versuchen 93,4 und 93,6% des gesammten Stickstoffs im Phosphorwolframsäureniederschlag, als die Fällung der Spaltungsprodukte von etwa 1 g Protaminsulfat aus 50 ccm. Lösung gewonnen war.<sup>2)</sup>

5 g lufttrockenes Clupeinsulfat wurden mit 45 ccm. 33%iger Schwefelsäure 8 Stunden am Rückflusskühler gekocht, auf 250 ccm. aufgefüllt und der Stickstoffgehalt der Lösung durch eine Kjeldahl-Bestimmung ermittelt.

Versuch I. 120 ccm. obiger Lösung, entsprechend 0,511 g Stickstoff und 1,61 g Clupein (nach der Formel  $C_{30}H_{57}N_{17}O_6$ <sup>3)</sup> berechnet) wurden in einer 5% Schwefelsäure enthaltenden Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die Stickstoffbestimmung des ausgewaschenen Niederschlags und des Filtrats ergab

im Niederschlag: 0,4256 g Stickstoff,

im Filtrat: 0,0770 „ „

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 186.

2) Stickstoffbestimmung im Filtrat ohne Auswaschen des Niederschlags.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 168.

Wenn man die Löslichkeit des phosphorwolframsauren Arginins, welche in diesem Falle nach Gulewitsch's Bestimmungen<sup>1)</sup> wenige Milligramme betragen kann, vernachlässigt, so ergibt sich, dass von dem gesammten Stickstoff der Spaltungsprodukte 83,3% auf Arginin entfallen.

Versuch II. In 120 ccm. derselben Lösung wurde die Schwefelsäure durch Baryt zum grössten Theil entfernt. Die Untersuchung des Filtrats ergab, dass der Niederschlag trotz sorgfältigen Auswaschens 0,022 g Stickstoff (etwa 4% des Ganzen) zurückgehalten hatte. Aus der Flüssigkeit wurde sodann das Arginin mit Silbersulfat und Baryt gefällt.

Im Niederschlag sind enthalten: 0,4235 g Stickstoff,

› Filtrat                   ›                   ›                   0,0605                   ›                   ›

Somit entfallen von dem gesammten Stickstoff der Spaltungsprodukte 82,9% auf Arginin.

100 Theile Clupein liefern demnach

nach Versuch I 82,1% Arginin,

›                   ›                   II 81,7%                   ›

Die Phosphorwolframsäurefällung ergibt also unter diesen Versuchsbedingungen das gleiche Resultat wie die Silberfällung.

Versuch III. 5 g lufttrockenes Clupeinsulfat wurden 30 Stunden mit 33%iger Schwefelsäure am Rückflusskühler gekocht. Die Gesamtmenge des Stickstoffs in der Flüssigkeit betrug 1,071 g. Hiernach sind 3,38 g Clupein (ebenso wie oben berechnet) für den Versuch verwendet worden.

Der Stickstoffgehalt des Silberbarytniederschlags betrug 0,903 g, der des Filtrats 0,125. Somit entfallen von dem gesammten Stickstoff der Spaltungsprodukte 84,3% auf Arginin. 100 Theile Clupein liefern demnach 82,95 Theile Arginin.<sup>2)</sup> Die Abweichung dieser Zahl von den Resultaten der Versuche I und II fällt in das Bereich der Versuchsfehler. Es ergibt sich also, dass die Spaltung schon bei achtstündigem

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 193–196.

<sup>2)</sup> Die Menge des im ersten Barytniederschlage verbliebenen Stickstoffs betrug 0,027 g, d. h. etwa 2% des Gesamtstickstoffs.

Kochen mit 33%iger Schwefelsäure eine vollständige gewesen ist.

### 3. Sturin.

Das Sturin wurde in der früher beschriebenen Weise<sup>1)</sup> als Sulfat dargestellt und durch 8stündiges Kochen mit 33%iger Schwefelsäure gespalten. Die Gesamtmenge des Stickstoffs betrug 1,379 g entsprechend 4,676 g Sturin.<sup>2)</sup> Davon verblieben im Barytniederschlag 0,0616 g Stickstoff, entsprechend 4,5% des gesammten Stickstoffs.

Der durch Baryt und Silbersulfat erhaltene Niederschlag enthielt 1,085 g N, d. i. 78,7% des gesammten Stickstoffs. Davon waren im Histidinniederschlag enthalten 0,163 g N, entsprechend 0,6020 g Histidin. Somit waren 11,8% des gesammten Stickstoffs in Form von Histidin vorhanden. Die Menge des Histidins betrug 12,9% des zersetzten Sturins. Im Argininniederschlag waren vorhanden 0,876 g N entsprechend 2,72 g Arginin. Somit war 63,5% des Gesamtstickstoffs im Arginin enthalten. Die Menge des bei der Spaltung gebildeten Arginins betrug 58,2% des zersetzten Sturins.

Die polarimetrische Untersuchung ergab 0,274 g Arginin, d. i. 58,6% des gespaltenen Sturins. Im Filtrat vom Silberbarytniederschlag wurde das Lysin ohne vorhergehende Phosphorwolframsäurefällung als Pikrat bestimmt. Die Bestimmung ergab 0,6042 g Lysin, somit würden 100 Theile Sturin 12,9 Theile Lysin liefern. Die gefundene Lysinmenge entspricht 0,1158 g Stickstoff, somit sind 8,4% des ganzen Stickstoffs in Form des Lysins vorhanden. In dem unbekannten Rest befinden sich noch 0,1101 g Stickstoff, d. i. 8% des ganzen Stickstoffs. Die Vertheilung des Stickstoffs auf die Spaltungsprodukte des Sturins war hiernach folgende:

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 173.

2) Das Sturin wurde nach der Formel  $C_{38}H_{61}N_{17}O_7$ , welche der genaueste Ausdruck der Analysen ist (diese Zeitschrift Bd. XXV, S. 174), berechnet.

Tabelle I.

Vertheilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Sturins.

	Stickstoffmenge		Procente des	
	in g		Gesamtnick- stoffs	
Gesamtmenge . . . . .	1,379	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . . .	1,155	—	83,7	—
Davon a) im Histidin . . . . .	—	0,163	—	11,8
b) im Arginin . . . . .	—	0,876	—	63,5
c) im Lysin . . . . .	—	0,116	—	8,4
B. Stickstoff in unbekannter Form . .	0,224	—	16,3	—
Davon a) im Barynniederschlag . . . .	—	0,062	—	4,5
b) im Silberniederschlag (als Bei- mengung zu den Basen) . . . .	—	0,052	—	3,8
c) im Filtrat des Lysinpirats . .	—	0,110	—	8,0

Die bei der Zersetzung des Sturins entstehenden Mengen der Hexonbasen ergeben sich aus folgender Tabelle:

Tabelle II.

	Gramm	Procente
Zersetztes Sturin . . . .	4,676	100
Histidin . . . . .	0,602	12,9
Arginin . . . . .	2,72	58,2
Lysin . . . . .	0,604	12,9

Dividirt man die ermittelten Gewichtsmengen der drei Hexonbasen durch ihre Molekulargewichte, so erhält man folgende Zahlen: Histidin : 3,9; Lysin : 4,1; Arginin : 15,6. Hieraus ist zu schliessen, dass die Basen in dem Molekularverhältniss 1 Mol. Histidin : 1 Mol. Lysin : 4 Mol. Arginin aus dem Sturin hervorgehen.

Die weiteren Schlussfolgerungen aus diesen Ergebnissen mögen bis zur Vollendung weiterer im hiesigen Institut im Gange befindlicher Arbeit verschoben werden.

Vergleichen wir diese Resultate mit den von A. Kossel

so ergibt sich, dass der Argininstickstoff nur wenig von den früheren Ergebnissen abweicht, dass jedoch der Histidin- und der Lysinstickstoff früher durchgehends zu hoch gefunden worden sind. Wir sehen davon ab, weitere Betrachtungen über den «Stickstoff in unbekannter Form» anzustellen, es möge jedoch bemerkt werden, dass aus der Vertheilung dieses Stickstoffs in die beiden Niederschläge und in das Filtrat des Lysinpirats durchaus nicht der Schluss gezogen werden darf, dass neben den Hexonbasen mehrere Spaltungsprodukte aus dem Sturin hervorgehen. Es ist wohl möglich, dass die Zurückhaltung der an sich geringen Mengen stickstoffhaltiger Substanz in den Niederschlägen auf Schwierigkeiten des Auswaschens beruht oder dass geringe Mengen schwer löslicher, in den Niederschlägen haftender Produkte durch Nebenreactionen gebildet worden sind.

#### 4. Cyclopterin.

Das von Morkowin<sup>1)</sup> im hiesigen Institut aus den Testikeln von *Cyclopterus lumpus* dargestellte Cyclopterin hat ein ganz besonderes Interesse für die Beurtheilung des Verhältnisses der Protamine zu den complexen Eiweissstoffen. Wie Morkowin fand, besitzt das Cyclopterin die charakteristischen Eigenschaften der Protamine, unterscheidet sich jedoch von den übrigen Protaminen dadurch, dass es die Millon'sche Reaction in ausgeprägter Weise gibt. Die folgenden Untersuchungen erweisen, dass diejenige Gruppe, welche zu der Millon'schen Reaction Veranlassung gibt, bei der Spaltung des Cyclopterins als Tyrosin auftritt, dass hier also derselbe aromatische Atomcomplex vorhanden ist, wie bei den Eiweisskörpern im engeren Sinne des Worts.

Die Darstellung des Cyclopterinsulfats aus den mit Alkohol und Aether erschöpften reifen Testikeln des «Seehasen»<sup>2)</sup>

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 185.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 313.

3) Für diese Darstellung diente der Rest des von Morkowin verarbeiteten Testikelpräparates.

wurde ebenso ausgeführt, wie bei den übrigen Protaminen. Von dem lufttrocknen Cyclopterinsulfat wurden 3,5 g mit einer Mischung von 21 ccm. Wasser und 10,5 ccm. concentrirter Schwefelsäure 12 Stunden gekocht.

Die Lösung enthielt 0,6552 g Stickstoff, entsprechend 2,2 g Cyclopterin. Nach Entfernung der Schwefelsäure mit Baryt waren in der Lösung nur noch 0,594 g N nachweisbar, im Barytniederschlag somit 0,061 d. i. 9,4% des gesammten Stickstoffs verblieben. Von dieser Flüssigkeit wurde für die weitere Analyse soviel entnommen, wie 0,575 g N der ursprünglichen Lösung oder 1,93 g des zersetzten Cyclopterins entsprach. Diese Flüssigkeit wurde auf 20 ccm. eingedampft und blieb 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Es schieden sich während dieser Zeit Krystallnadeln aus, deren Menge im trockenen Zustande 0,1612 g betrug, welche dem Aussehen nach Tyrosinnadeln glichen und die Millon'sche Reaction gaben. Dieselben wurden nach nochmaligem Umkrystallisiren nach Kjeldahl analysirt. Es sättigten 0,1179 g der Substanz 6,4 ccm.  $\frac{1}{10}$  N-Säure.

Gefunden		Berechnet für Tyrosin
N	7,6	7,7

Auf die ganze Menge berechnet betrug das Tyrosin 0,1836 g, also 8,3% des zersetzten Cyclopterins; 2,2% des gesammten Stickstoffs waren im Tyrosin enthalten. Die vom Tyrosin abfiltrirte Flüssigkeit wurde verdünnt und mit Silbersulfat und Baryt gefällt. Die Menge des im Silberniederschlag enthaltenen Stickstoffs betrug (aufs Ganze berechnet) 0,4434 g. Der Niederschlag, in oben beschriebener Weise auf Histidin verarbeitet, zeigte sich frei von Histidin. Somit war die ganze Menge der im Silberniederschlag vorhandenen Substanz auf Arginin zu beziehen. Das Gewicht des gesammten bei diesem Versuch entstandenen Arginins betrug hiernach 0,1376 g oder 62,5% des zersetzten Cyclopterins. Die polarimetrische Untersuchung ergab 0,1355 g Arginin oder 61,6% des Cyclopterins. Nach ersterer Bestimmung waren 67,7% des gesammten Stickstoffs in Form von Arginin vorhanden. Das Filtrat vom Argininniederschlag erwies sich frei von Lysin.

	Stickstoffmenge		Procente des	
	in g		Gesamtnick- stoffe	
Gesammtmenge . . . . .	0,655	—	100	—
Stickstoff des Arginins . . . . .	0,443	—	67,7	—
»    » Tyrosins . . . . .	0,014	—	2,2	—
Stickstoff unbekannter Form . . . . .	0,198	—	30,1	—
Davon im Barytniederschlag . . . . .	—	0,061	—	9,4
Im Filtrat des Lysins . . . . .	—	0,137	—	27,7

Die beim Cyclopterin erhaltenen Resultate sind in mehrfacher Beziehung lückenhaft. Die zu Gebote stehende Menge des Materials war eine geringe und gestattete keine Wiederholung der Analyse, eine solche wäre aber im Hinblick auf die auffallende hohe Zahl des im Barytniederschlag verbliebenen Stickstoffs besonders wünschenswerth. Ferner sind auch die Elementaranalysen noch nicht ausreichend, um aus dem Stickstoffgehalt der Flüssigkeit die Menge des zur Zersetzung benutzten Cyclopterins mit Genauigkeit zu berechnen.

Diese Resultate sind trotzdem schon jetzt publicirt worden, weil die Beschaffung des Ausgangsmaterials von Zufälligkeiten abhängt und weil sich schon aus diesen vorläufigen Bestimmungen principiell wichtige Schlussfolgerungen ableiten. Diese sind folgende: 1. das Mengenverhältniss, in welchem das Arginin aus dem Cyclopterin hervorgeht, ist ein so hohes, wie es bisher nur bei Protaminen gefunden worden ist. Diese Thatsache bestätigt die schon aus den Eigenschaften des Cyclopterins gezogene Schlussfolgerung, dass das Cyclopterin zu den Protaminen zu rechnen ist; 2. das Cyclopterin gehört zu denjenigen Protaminen, welche nur Arginin, kein Histidin und Lysin liefern; 3. das Cyclopterin liefert bei der Spaltung mehr als 8% Tyrosin.

## 5. Histon aus Kalbsthymus.

Die Darstellung des für diesen Versuch benutzten Histons war folgende: das fein zerkleinerte Thymusgewebe wurde mit

wässrige Extract mit Salzsäure versetzt, bis der Gehalt an Salzsäure 0,8 % betrug. Der Niederschlag wurde durch Centrifugiren und Filtriren entfernt und das klare Filtrat mit Ammoniak gefällt. Das ausgefällte Histon wurde mit ammoniakhaltigem Wasser ausgewaschen, in Alkohol gebracht und sodann mit Alkohol, zuletzt mit Aether völlig extrahirt.

Zur Zersetzung wurden ca. 25 g der lufttrockenen Substanz benutzt, die mit 75 g concentrirter Schwefelsäure und 150 g Wasser 12 Stunden am Rückflusskühler gekocht wurden. Es schied sich dabei eine geringe Menge schwarz gefärbter Substanz ab. Dieselbe wurde durch Glaswolle abfiltrirt und nach Kjeldahl in ihr der Stickstoff bestimmt. Sie lieferte 0,033 g Stickstoff. Das Filtrat von der Huminsubstanz enthielt 3,328 g Stickstoff. Demnach hatte das gesammte zur Zersetzung gebrachte Histon  $3,328 + 0,033 = 3,361$  g Stickstoff geliefert.

Die Zersetzungsflüssigkeit wurde durch Baryt vom grössten Theil der Schwefelsäure befreit und der als Ammoniak abgespaltene Stickstoff durch Destillation mit Magnesia bestimmt. Es waren im Ganzen 0,251 g Stickstoff im austreibbaren Ammoniak vorhanden.

Nach der Austreibung des Ammoniaks wurde die Magnesia durch Baryt, der Baryt wieder mit Schwefelsäure abgeschieden, die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht und der Gehalt an Stickstoff von Neuem bestimmt. Es zeigte sich, dass sie jetzt nur noch 2,642 g Stickstoff besass. Es waren also 0,468 g Stickstoff an Substanzen gebunden, die mit den Baryt- und Magnesianiederschlägen mitgefallen waren und aus denselben sich nicht auswaschen liessen.

Die von Ammoniak etc. befreite Zersetzungsflüssigkeit wurde auf die Hexonbasen verarbeitet. Es wurde Arginin und Histidin durch Silbersulfat und Baryt ausgefällt und ihre Trennung, wie vorstehend angegeben ist, vorgenommen.

Das gewonnene Histidindichlorid zeigte lange Zeit keine Neigung zur Krystallisation, erstarrte aber schliesslich fast plötzlich zu einer Krystallmasse, die in ihrem Aussehen merklich von den Krystallisationen des gewöhnlichen Histidindichlorids



bestimmt und da ihre Menge nicht für mehrere Analysen hinreichte, die gefundene Stickstoffzahl auf Histidin verrechnet. Es wurden erhalten 0,060 g N, die 0,222 g freiem Histidin entsprechen würden.

Das gewonnene Arginin wurde in das neutrale Arginin-nitrat übergeführt. Dasselbe krystallisirte bis auf den letzten Tropfen. Es unterschied sich in seinem Aussehen, in seiner Löslichkeit etc. nicht von dem gewöhnlichen Argininnitrat. Das Argininnitrat wurde im Vacuum bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Es wurden 3,718 g neutrales Argininnitrat, entsprechend 2,63 g freiem Arginin, mit 0,846 g Stickstoff erhalten.

Das auskrystallisirte Argininnitrat war sofort analysenrein. Denn 0,295 g der im Vacuum getrockneten Masse lieferten bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung bei 16° C. und 746 mm. Barometerstand 73,2 ccm. Stickstoff.

Für  $C_6H_{14}N_4O_6 \cdot HNO_3 + \frac{1}{2} H_2O$

Berechnet  
N = 28,45 %

Gefunden  
N = 28,54 %

Das Filtrat vom Arginin- und Histidinsilber wurde auf Lysin verarbeitet. Es wurden erhalten 3,622 g Lysinpikrat, entsprechend 1,41 g freiem Lysin mit 0,270 g Stickstoff.

Vertheilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Thymushistons.

	Stickstoff in g		Procente des Gesamtstickstoffs	
Gesamtmenge . . . . .	3,361	—	100	—
A) Basenstickstoff . . . . .	1,427	—	42,46	—
Davon a) im Ammoniak . . . . .	—	0,251	—	7,46
b) im Histidin . . . . .	—	0,060	—	1,79
c) im Arginin . . . . .	—	0,846	—	25,17
d) im Lysin . . . . .	—	0,270	—	8,04
B) Stickstoff in nicht bestimmter Form	1,934	—	57,54	—
Davon a) unlöslich abgeschieden . . . .	—	0,033	—	0,98
b) in Baryt- und Magnesianieder- schlägen . . . . .	—	0,468	—	13,94

Die Mengenverhältnisse der aus dem Thymushiston hervorgehenden Hexonbasen ergeben sich, unter der Voraussetzung, dass das Thymushiston 18,35 % Stickstoff enthält, aus folgender Tabelle:

	Gramm	Procente
Zersetztes Thymushiston	18,32	100
Ammoniak . . . . .	0,304	1,66
Histidin . . . . .	0,222	1,21
Arginin . . . . .	2,63	14,36
Lysin . . . . .	1,41	7,7

#### 6. Histon aus dem Sperma des Kabeljau.

Bei der Verarbeitung der reifen Testikeln von *Gadus Morrhua* fand sich statt des Protamins in erheblicher Menge ein Eiweisskörper vor, welcher die charakteristischen Eigenschaften des Histons besass. In dieser Hinsicht weichen also die reifen Spermatozoen des Dorsches von denen der bisher untersuchten Fische ab.

Aus einigen Angaben früherer Untersucher kann man jedoch schliessen, dass das Vorkommen der Histone in den Spermatozoen ein verbreitetes ist. Die ältesten Angaben Miescher's<sup>1)</sup> über «eine peptonartige Substanz von basischen Eigenschaften» in den reifen Testikeln des Karpfens und den unreifen Hoden des Lachses sind allerdings so knapp, dass man aus ihnen keinen Schluss auf die Natur dieses Körpers ziehen kann; nachdem jedoch die Histone im Jahre 1884 von A. Kossel<sup>2)</sup> als eine eigenartige Gruppe von Eiweisskörpern charakterisirt worden war, erschienen auch von Miescher im Jahre 1896 genauere Angaben<sup>3)</sup> über den histonartigen Körper des unreifen Lachsspermas. Obwohl die Eigenschaften

<sup>1)</sup> Verhandlungen der naturforschenden Gesellschaft in Basel Bd. VI, S. 138—208, 1874.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift Bd. VIII, S. 511.

<sup>3)</sup> Archiv f. experimentelle Pathologie u. Pharmakologie Bd. 37.

wandtschaft mit den Histonen schliessen lassen, findet sich in der Publication kein Hinweis auf die Aehnlichkeit mit diesen Stoffen.<sup>1)</sup> Erst Mathews<sup>2)</sup> behauptete die Zugehörigkeit eines aus den Spermatozoen von *Arbacia* dargestellten Körpers zu den Histonen und endlich fand Bang<sup>3)</sup> in den unreifen Spermatozoen der Makrele einen von ihm zur Histongruppe gestellten Körper, den er *Scombron* nennt.

Der von uns untersuchte Körper wurde in folgender Weise aus den Spermatozoen dargestellt. Aus den Testikeln des Kabeljau wurden in der früher beschriebenen<sup>4)</sup> Weise die Spermatozoen gewonnen und mit Alkohol und Aether extrahirt.

Die so vorbereiteten getrockneten Massen wurden mit verdünnter Salzsäure (die im Liter 20 ccm. concentrirte Salzsäure enthielt) gut durchgeschüttelt, filtrirt und diese Extraction mehrfach wiederholt. Das Filtrat wurde mit Kochsalz versetzt, bis die Lösung fast gesättigt war, der entstandene Niederschlag abfiltrirt und mit gesättigter Kochsalzlösung ausgewaschen. Der Niederschlag wurde jetzt mit Wasser angerieben, die Flüssigkeit in Dialysirschläuche gefüllt und 24 Stunden gegen fließendes Wasser dialysirt. Hierbei ging das durch Kochsalz gefällte Histon wieder in Lösung. Aus der filtrirten klaren Lösung wurde das Histon jetzt mit Ammoniak ausgefällt, mit ammoniakhaltigem Wasser, sodann mit Alkohol und zuletzt mit Aether gewaschen. Der so dargestellte Körper, den wir als *Gadushiston* bezeichnen wollen, zeigte die bekannten Reactionen der Histone; zwei nach Kjeldahl ausgeführte Stickstoffbestimmungen ergaben einen Stickstoffgehalt von 18,65 und 18,64%.

Ueber die Ausführung der Analyse sei Folgendes be-

---

1) Anscheinend hat Miescher in dem Verhalten zu Quecksilberchlorid ein Hinderniss gesehen, den von ihm gewonnenen Körper mit dem Histon zu identificiren.

2) Diese Zeitschrift Bd. XXIII, S. 399.

3) Diese Zeitschrift Bd. XXVII, S. 463.

4) Diese Zeitschrift Bd. XXII, S. 178.

merkt: 45 g des lufttrockenen Gadushistons wurden mit einer Mischung von 137 g concentrirter Schwefelsäure und 273 ccm. Wasser 18 Stunden am Rückflusskühler gekocht. In diesem Fall schied sich ein Theil der Zersetzungsprodukte in der Weise ab, dass derselbe auf einem Filter gesammelt und ausgewaschen werden konnte. In diesem Niederschlag wurde die Menge des Stickstoffs bestimmt.

Das Histidin wurde als Dichlorid bei 40° im Vacuum getrocknet. Ebenso wie beim Thymushiston entstanden auch hier Zweifel über die Identität des Präparats mit dem Histidin, da die Krystalle in ihrem Aussehen und in ihrer Löslichkeit von denen anderer Herkunft abwichen. Wir sind mit der weiteren Untersuchung dieser Frage beschäftigt.<sup>1)</sup>

Die Bestimmung des Arginins wurde in diesem Falle nach drei verschiedenen Methoden ausgeführt: a) polarimetrisch, b) durch Stickstoffbestimmung in derjenigen Flüssigkeit, welche nur Arginin enthielt, c) durch Wägung als Arginindinitrat. Die polarimetrische Bestimmung gab hier — wie in den meisten Fällen — ein niedrigeres Resultat, während Wägung und Kjeldahl-Bestimmung gut übereinstimmten. Es ist dies aus folgender Zusammenstellung ersichtlich.

	Arginin in g	Arginin in Procenten des Histons
Polarimetrisch . . . . .	5,50	14,28
Durch Kjeldahl-Bestimmung .	5,98	15,52
Durch Wägung des Dinitrats .	6,01	15,61

Die Untersuchung des durch Phosphorwolframsäure erzeugten Niederschlages ergab das bemerkenswerthe Resultat, dass in diesem Falle nur etwa die Hälfte des darin enthaltenen

<sup>1)</sup> Es ist bemerkenswerth, dass Lawrow bei der polarimetrischen Untersuchung des aus Histon dargestellten Histidinchlorids ungefähr die gleichen Werthe fand, wie A. Kossel für das Histidin anderer Herkunft (trotz Lawrow's gegentheiliger Bemerkungen, diese Zeitschr. Bd. XXVIII, S. 392).

dieses Niederschlages betrug nämlich 1,215 g, während daraus nur 3,20 g Lysin mit 0,614 g Stickstoff enthalten war. Aus der vom Lysin völlig befreiten Flüssigkeit liess sich eine beträchtliche Menge stickstoffhaltiger organischer Substanz gewinnen, die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar, also bei der vorhergehenden Phosphorwolframsäurefällung nur mitgerissen war. Die eingedampfte Flüssigkeit gab Millon's Reaction und lieferte eine erhebliche Menge von Krystallen, welche den Knollen des Leucins und homologen Monoamidosäuren glichen.

Die Vertheilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Gadushistons ist aus folgender Tabelle zu ersehen.

Vertheilung des Stickstoffs unter den Spaltungsprodukten des Gadushistons.

	Stickstoff in g		Procente des Gesamtstickstoffs
Gesammtmenge . . . . .	7,165		100
A) Basen-Stickstoff . . . . .	3,022		42,0
Davon a) im Ammoniak . . . . .		0,235	3,3
b) im Histidin . . . . .		0,247	3,3
c) im Arginin (Kjeldahl-Bestimmg.)		1,926	26,9
d) im Lysin . . . . .		0,614	8,5
B) Stickstoff in nicht bestimmter Form .	4,143		58,0
Davon a) unlöslich abgeschieden . . . .		0,060	0,8
b) im ersten Baryt-Niederschlag .		0,189	2,6
c) im Magnesia-Baryt-Niederschlag		0,177	2,4
d) im Silberniederschlag (Beimengung der Basen) . . . . .		0,397	5,5
e) im Phosphorwolframsäure-Niederschlag neben Lysin . . .		0,601	8,4
f) im Filtrat . . . . .		2,719	38,3

Die Mengenverhältnisse der aus dem Gadushiston hervorgehenden Hexonbasen ergeben sich aus der folgenden Zusammenstellung.

	Gramm	Procente
Zersetztes Gadushiston . . . .	38,52	100
Ammoniak . . . . .	0,286	0,74
Histidin . . . . .	0,91	2,34
Arginin (Kjeldahl-Bestimmung)	5,98	15,52
Lysin . . . . .	3,20	8,30

## 7. Glutencasein.

Zu weiteren Versuchen dienten Eiweissstoffe pflanzlichen Ursprungs und zwar das Glutencasein, Glutendfibrin und Mucedin, welche nach Ritthausen's Vorschriften<sup>1)</sup> aus Weizenmehl dargestellt wurden und Zein aus Maismehl. Für die Wahl dieser Eiweissstoffe war zunächst der Wunsch massgebend, möglichst verschiedenartige Typen von Eiweissstoffen den Untersuchungen zu unterwerfen, um festzustellen, wie weit sich die Verschiedenheiten bezüglich des Vorkommens der Hexonbasen erstrecken.

Das Glutencasein wurde zugleich benutzt, um den Einfluss der Spaltungsmethode auf die Menge der Hexonbasen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden von einem Präparat des Glutencaseins drei Portionen von 45—50 g entnommen. Die erste Portion wurde durch 12stündiges Kochen mit Jodwasserstoff gespalten und nach dem oben S. 178 beschriebenen Verfahren weiter verarbeitet, die Spaltung der zweiten Portion wurde durch stärkere, die der dritten durch schwächere Schwefelsäure ausgeführt.

### A. Spaltung mit Jodwasserstoffsäure.

Die Vertheilung des Stickstoffs der Spaltungsprodukte ergibt sich aus folgender Tabelle.

<sup>1)</sup> Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten, Hülsenfrüchte und Oelsamen. Bonn 1872.

	Stickstoff in g	Procente des Gesamtnick- stoffs
Gesamtmenge . . . . .	7,623	100
A) Basen-Stickstoff . . . . .	2,418	31,6
Davon a) im Ammoniak . . . . .		1,455
b) im Histidin . . . . .		0,114
c) im Arginin . . . . .		0,676
d) im Lysin . . . . .		0,173
B) Stickstoff in nicht bestimmter Form .	5,205	68,4
Davon a) im Blei-Niederschlag . . . . .		0,752
b) nach Entfernung des Bleis ab- geschieden (Tyrosin) . . . . .		0,095
c) im Magnesia-Baryt-Niederschlag		0,170
d) Beimengung der Basen im Silber- Niederschlag . . . . .		0,229
e) neben Lysin im Phosphorwolfram- säure-Niederschlag . . . . .		0,272
f) im Filtrat . . . . .		3,687

Die Mengenverhältnisse der Spaltungsprodukte sind fol-  
gende :

	Gramm	Procente
Zersetztes Glutencasein . . .	47,03	100
Ammoniak . . . . .	1,77	3,8
Histidin . . . . .	0,42	0,9
Arginin . . . . .	2,10	4,5
Lysin . . . . .	0,90	1,9

#### *B. Spaltung des Glutencaseins mit stärkerer Schwefelsäure.*

Es wurden ca. 54 g lufttrockener Substanz mit 162 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 324 ccm. Wasser 12 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Isolirung der Spaltungs-  
produkte geschah nach vorstehend geschildertem Verfahren.  
Die Vertheilung des Stickstoffs der Spaltungsprodukte ergibt  
sich aus folgender Tabelle.

# Vertheilung des Stickstoffs auf die Spaltungsprodukte des Glutencaseins

(Spaltung mit stärkerer Schwefelsäure).

	Stickstoff in g		Procente des Gesamt- stickstoffs	
Gesamtmenge . . . . .	7,999	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . . .	1,906	—	23,87	—
Davon a) im Ammoniak . . . . .	—	0,919	—	11,49
b) im Histidin . . . . .	—	0,102	—	1,28
c) im Arginin . . . . .	—	0,669	—	8,4
d) im Lysin . . . . .	—	0,216	—	2,7
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form . . . . .	6,093	—	76,13	—
Davon a) im Barytniederschlag . .	—	1,251	—	15,64
b) in den Magnesiabaryt- niederschlägen . . . . .	—	0,058	—	0,72
c) Beimengung der Basen im Silberniederschlag . . . . .	—	0,319	—	3,99

Die Mengenverhältnisse der Spaltungsprodukte ergeben sich aus folgender Zusammenstellung. Das Glutencasein besass 16,20 % Stickstoff (bei 120° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet). Es berechnet sich daraus:

	Gramm	Procente
Zersetztes Glutencasein .	49,35	100
Ammoniak . . . . .	1,116	2,26
Histidin . . . . .	0,377	0,76
Arginin . . . . .	2,079	4,2
Lysin . . . . .	1,128	2,29

## C. Spaltung des Glutencaseins mit schwächerer Schwefelsäure.

Es wurden ca. 50 g lufttrockener Substanz mit 150 Gramm concentrirter Schwefelsäure und 300 g Wasser 8 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die folgende Tabelle zeigt die Ver-



Abhängigkeit des Stickstoffs auf die verschiedenen Spaltungsprodukte.

# **Vertheilung des Stickstoffs auf die Spaltungsprodukte des Glutencaseins (Spaltung mit schwächerer Schwefelsäure).**

	Stickstoff in g		Procente des Gesamt- stickstoffs	
Gesamtmenge . . . . .	7,368	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . . .	2,0179	—	27,39	—
Davon a) im Ammoniak <sup>1)</sup> . . . . .	—	0,9874	—	13,40
b) im Histidin . . . . .	—	0,1923	—	2,6
c) im Arginin . . . . .	—	0,6647	—	9,0
d) im Lysin . . . . .	—	0,1735	—	2,39
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form . . . . .	5,3501	—	72,61	—
Davon im Baryt- und Magnesia- niederschlag . . . . .	—	1,0886	—	14,78

Die Mengenverhältnisse der Spaltungsprodukte zeigt nachstehende Zusammenstellung:

	Gramm	Procente
Zersetztes Glutincasein .	45,45	100
Ammoniak . . . . .	1,199	2,64
Histidin . . . . .	0,7097	1,56
Arginin . . . . .	2,065	4,54
Lysin . . . . .	0,9047	2,0

Auffällig ist, dass bei der Spaltung des Glutincaseins mit schwächerer Schwefelsäure und bei kürzerer Einwirkung der

<sup>1)</sup> Um zu sehen, ob bei der Destillation des Ammoniaks andere flüchtige Basen mitgingen, wurde von einem Theil der Zersetzungsflüssigkeit das übergetriebene Ammoniak als Ammoniumchlorid zur Wägung gebracht. Gewichtsanalytisch wurden 0,9832 g Stickstoff = 13,34% des Gesamtstickstoffs als an Ammoniak gebunden nachgewiesen.

Säure mehr Ammoniak abgespalten wurde, wie durch stärkere Schwefelsäure. Addirt man jedoch in beiden Fällen den Huminstickstoff und den Ammoniakstickstoff, so erhält man sehr annähernd die gleiche Zahl, denn bei der Spaltung durch schwächere Schwefelsäure sind im Huminstickstoff 14,78%, im Ammoniakstickstoff 13,4%, also zusammen 28,18% des Gesamtstickstoffs enthalten. Bei der Spaltung mit stärkerer Schwefelsäure fanden wir in den Huminsubstanzen 16,36%, im Ammoniak 11,49%, also zusammen 27,85% des Gesamtstickstoffs vor. Es liegt danach der Gedanke nahe, dass, ähnlich wie in den Versuchen von Udransky,<sup>1)</sup> ein Theil des bei der Spaltung gebildeten Ammoniaks unter der Einwirkung der stärkeren Säure an die Huminsubstanzen getreten ist..

#### Glutenfibrin.

Es wurden ca. 50 g lufttrockene Substanz mit 150 g concentrirter Schwefelsäure und 300 g Wasser 14 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Ueber die erhaltenen Spaltungsprodukte geben die nachstehenden Tabellen Aufschluss. Bezüglich des Lysins, das weder aus dem Glutenfibrin noch den übrigen in Alkohol löslichen pflanzlichen Eiweisskörpern isolirt werden konnte, ist noch zu bemerken, dass, als wir versuchten, aus dem Filtrat von der Silberfällung durch Phosphorwolframsäure einen Niederschlag zu erzeugen, wir erst auf Zusatz eines starken Ueberschusses von Phosphorwolframsäure einen solchen erhielten. Derselbe schied sich jedoch nicht wie gewöhnlich körnig ab, sondern als schmieriger, stark gefärbter Syrup, der auch nach längerem Stehen nicht fest wurde. Bei seiner Zersetzung vermochten wir nur Leucin und Tyrosin, aber kein Lysin zu gewinnen. Die übrigen alkohollöslichen pflanzlichen Eiweisskörper gaben nach der Entfernung des Histidins und Arginins mit Phosphorwolframsäure Niederschläge, die sich dem eben geschilderten durchaus ähnlich verhielten. Auch aus ihnen liess sich wohl Leucin und Tyrosin, aber kein Lysin isoliren.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 42 u. f.

gende: Das Glutenfibrin enthielt bei 120° C. getrocknet 17,05% Stickstoff. Danach berechnet sich:

	Gramm	Procente
Zersetztes Gutenfibrin .	44,76	100
Ammoniak . . . . .	1,741	3,89
Histidin . . . . .	0,684	1,53
Arginin . . . . .	1,363	3,05
Lysin . . . . .	0	0

### Vertheilung des Stickstoffs auf die Spaltungsprodukte des Glutenfibrins.

	Stickstoff in g		Procente des Gesamtstickstoffs	
Gesamtmenge . . . . .	7,632	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . . .	2,0583	—	26,96	—
Davon a) im Ammoniak . . . . .	—	1,434	—	18,78
b) im Histidin . . . . .	—	0,1857	—	2,43
c) im Arginin . . . . .	—	0,4386	—	5,75
d) im Lysin . . . . .	—	0	—	0
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form . . . . .	5,5737	—	73,04	—
Davon in den Baryt- und Magnesia-niederschlägen . . . . .	—	0,823	—	10,78

### Gliadin.

Von Gliadin wurden ca. 50 g lufttrockene Substanz mit 150 g concentrirter Schwefelsäure und 300 g Wasser 14 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Bezüglich der gewonnenen Zersetzungsprodukte siehe die Tabellen.

Das zur Zersetzung gebrachte Gliadin enthielt bei 120° C. getrocknet 17,25% Stickstoff. Danach berechnen sich folgende Mengenverhältnisse für die Zersetzungsprodukte des Gliadins:

	Gramm	Procente
Zersetztes Gliadin . . .	43,60	100
Ammoniak . . . . .	1,781	4,1
Histidin . . . . .	0,524	1,20
Arginin . . . . .	1,199	2,75
Lysin . . . . .	0	0

Vertheilung des Stickstoffs auf die Spaltungsprodukte des Gliadins.

	Stickstoff in g		Procente des Gesamtstickstoffs	
Gesammtmenge . . . . .	7,519	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . . .	1,9941	—	26,52	—
Davon a) im Ammoniak . . . . .	—	1,467	—	19,51
b) im Histidin . . . . .	—	0,1421	—	1,89
c) im Arginin . . . . .	—	0,385	—	5,12
d) im Lysin . . . . .	—	0	—	0
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form . . . . .	5,5249	—	73,48	—
Davon im Baryt- und Magnesia-niederschlag . . . . .	—	0,886	—	11,78

Mucedin.

Ungefähr 50 g der lufttrockenen Substanz wurden mit 150 g concentrirter Schwefelsäure und 300 g Wasser 14 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Bezüglich der Vertheilung der einzelnen Spaltungsprodukte siehe nachstehende Tabellen. Das Mucedin enthielt bei 120° C. getrocknet 16,82% N. Danach berechnet sich:

	Gramm	Procente
Zersetztes Mucedin . .	44,18	100
Ammoniak . . . . .	1,868	4,23
Histidin . . . . .	0,188	0,43
Arginin . . . . .	1,382	3,13
Lysin . . . . .	0	0

	Stickstoff in g		Procente des Gesamtstickstoffs	
Gesammtmenge . . . . .	7,432	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . . .	2,0343	—	27,38	—
Davon a) im Ammoniak . . . . .	—	1,5385	—	20,70
b) im Histidin . . . . .	—	0,0510	—	0,69
c) im Arginin . . . . .	—	0,4448	—	5,99
d) im Lysin . . . . .	—	0	—	0
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form . . . . .	5,3977	—	72,62	—
Davon im Baryt- und Magnesia-niederschlag . . . . .	—	0,7695	—	10,36

## Zein.

Während sich die übrigen pflanzlichen Eiweisskörper unter Aufwendung reichlicher Mengen Alkohols in Form weisser, staubfeiner Pulver gewinnen liessen, vermochten wir das Zein schliesslich nur als hornartige Masse darzustellen, die sich nicht ganz von eingeschlossenem Alkohol befreien liess. Wir benutzten ca. 42 g der über Schwefelsäure getrockneten Substanz zur Zersetzung. Dieselben wurden mit 125 g concentrirter Schwefelsäure und 252 g Wasser während 14 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Bezüglich der erhaltenen Spaltungsprodukte siehe die Tabellen :

	Gramm	Procente
Zersetztes Zein <sup>1)</sup> . .	30,82	100
Ammoniak . . . . .	0,789	2,56
Histidin . . . . .	0,250	0,81
Arginin . . . . .	0,562	1,82
Lysin . . . . .	0	0

<sup>1)</sup> Die Berechnung wurde ausgeführt, indem nach Ritthausen's Angabe für Zein ein Gehalt von 15,58% N angenommen wurde.

# Vertheilung des Stickstoffs auf die Spaltungsprodukte des Zein.

	Stickstoff in Gramm.		Procente des Gesamstick- stoffs.	
Gesamtmenge . . . . .	4,802		100	
A. Basen-Stickstoff . . . . .	0,8981		18,70	
Davon a) im Ammoniak . . . . .		0,6497		13,53
b) im Histidin . . . . .		0,0677		1,41
c) im Arginin . . . . .		0,1807		3,76
d) im Lysin . . . . .		0		0
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form	3,9039		81,30	
Davon im Baryt-Magnesia-Niederschlag		0,5681		11,83

## Leim.

Für die Untersuchung wurde feine käufliche Gelatine verwandt.

Der Nachweis des Histidins und Lysins wurde nur qualitativ geführt, er fiel für beide Substanzen positiv aus, und zwar erwies sich die Menge des Histidins als sehr gering, die des Lysins hingegen als recht beträchtlich.<sup>2)</sup> Es wurden zwei Versuche angestellt: im ersten Falle wurde die Spaltung mit Schwefelsäure, im zweiten mit Jodwasserstoff bewirkt.

### A. Spaltung mit Schwefelsäure.

50 g lufttrockne Gelatine wurden mit einer Mischung von 50 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 100 ccm. Wasser 20 Stunden am Rückflusskühler gekocht.

Die Bestimmung des Arginins wurde nach Entfernung des Histidins mit Hülfe der Stickstoffbestimmung ausgeführt. Die polarimetrische Bestimmung fiel bei diesem Versuch viel zu niedrig aus.

### B. Spaltung mit Jodwasserstoff.

50 g lufttrockne Gelatine wurde mit 150 g Jodwasserstoffsäure 3 Stunden am Rückflusskühler gekocht.

<sup>2)</sup> Die Menge des Lysins betrug im Versuch B etwa 5—6% des trocknen Leims.

	Stickstoffmengen in Gramm		Procente des Gesamtnitrostoffs	
	Spaltung mit Schwefel- säure	Spaltung mit Jodwasser- stoff	Spaltung mit Schwefel- säure	Spaltung mit Jodwasser- stoff
Gesamt-Stickstoff . . . . .	7,000	7,070	100	100
Ammoniak-Stickstoff . . . . .	0,098	0,1918	1,4	2,7
Arginin-Stickstoff (Kjeldahl- Bestimmung) . . . . .	1,1614	1,014	16,6	14,3

Für die Berechnung der gefundenen Argininmenge auf Procente des untersuchten Leims wurde der von Paal gefundene Stickstoffgehalt des Leims: 18,12% zu Grunde gelegt. Hiernach erhält man folgende Tabelle:

	Gefundene Gewichtsmengen		Gewichts-Procente	
	Spaltung mit Schwefel- säure	Spaltung mit Jodwasser- stoff	Spaltung mit Schwefel- säure	Spaltung mit Jodwasser- stoff
Gespaltener Leim . . . . .	38,7	39,02	100	100
Ammoniak . . . . .	0,119	0,233	0,3	0,6
Arginin :				
a) polarimetrisch . . . . .		3,17		
b) Kjeldahl-Bestimmung .	3,61	3,15	9,3	8,1
c) Wägung als Dinitrat . .		3,17		

Die polarimetrische Bestimmung stimmte in diesem Falle genau mit der Kjeldahl-Bestimmung und der Wägung als Dinitrat überein.

Die Jodwasserstoffsplaltung hatte in diesem Falle weniger Arginin geliefert als die Spaltung mit Schwefelsäure. Es lässt sich aus diesen Versuchen nicht ersehen, ob die erstere überhaupt weniger tiefgreifend gewesen war oder ob sich ein Theil des Arginins durch nachträgliche Einwirkung wieder zersetzt hatte.

Hingegen war hier wie bei dem Versuch mit Glutencasein durch Jodwasserstoff mehr Ammoniak gebildet, wie durch Schwefelsäure.

### Elastin.

Qualitativ wurden weiterhin die Spaltungsprodukte des Elastins auf das Vorhandensein von Lysin untersucht. Es war die Frage, ob sich Lysin aus dem Elastin bildet, besonders deshalb von Interesse, weil seiner Zeit die Frage, ob überhaupt Hexonbasen aus dem Elastin gebildet werden, zur Discussion gekommen war.<sup>1)</sup> Es gelang uns damals, zunächst das Arginin nachzuweisen. Aus den Filtraten vom Argininsilber stellten wir dann später nach dem Verfahren Kossel's das Lysinpikrat dar. Die Ausbeute an demselben war eine geringe. Die Analyse desselben lieferte für Lysinpikrat gut stimmende Zahlen. 0,2032 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,2844 g Kohlensäure und 0,0853 g Wasser.

Für  $C_6H_{14}N_4O_8 \cdot C_6H_8N_2O_7$ .

Berechnet:  
C = 38,40 %  
H = 4,53 %

Gefunden:  
C = 38,18 %  
H = 4,69 %.

### Spongion.

Mehrfach gespalten haben wir sowohl mit Salzsäure wie mit Schwefelsäure grössere Mengen sorgfältig gereinigtes Spongion und die Spaltungsprodukte auf die verschiedenen Hexonbasen untersucht. In keinem Fall vermochten wir Histidin zu isoliren. Allerdings hatten wir damals noch nicht die im Vorstehenden mitgetheilte Methode zur Trennung des Histidins und Arginins ausgearbeitet, und es ist möglich, dass es später vielleicht doch noch gelingt, Histidin unter den Spaltungsprodukten des Spongions nachzuweisen. Stets reichlich, gleichgültig ob wir mit Salzsäure oder Schwefelsäure das Spongion zersetzten, erhielten wir Arginin und Lysin (Arginin 5—6 g, Lysin 3—4 g auf 100 g lufttrockenes Spongion). Dass sich das erhaltene Arginin und Lysin des Spongions in nichts von dem gewöhnlichen Arginin und Lysin unterschieden, bestätigten uns die Analyse und die polarimetrischen Untersuchungen.

Es gaben 0,165 g Argininnitrat bei 19° C und 746 mm. Barometerstand 41,6 ccm. Stickstoff.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 551.



Berechnet :  
N = 28,45 %

Gefunden :  
N = 28,61 %.

Das Lysin wurde als Lysindichlorid zur Analyse gebracht.

Berechnet :  
32,34

Gefunden :  
32,49 % Cl.

Die polarimetrischen Bestimmungen des Lysindichlorids sind von Henderson ausgeführt worden.<sup>1)</sup>

(Bezüglich des Glutaminsäure-Gehaltes siehe Nachtrag.)

#### **Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen.**

##### **I.**

Die von uns durch Spaltung mit Schwefelsäure erhaltenen Zahlen lassen sich in der auf Seite 207 befindlichen Tabelle zusammenfassen.

Sonstige Bestimmungen des Arginins unter den Zersetzungsprodukten der Eiweisskörper liegen nur sehr wenige vor. Hedin,<sup>2)</sup> durch dessen Untersuchungen überhaupt zuerst gezeigt worden ist, dass das von E. Schulze und Steiger entdeckte Arginin aus dem Eiweiss hervorgeht, hat auch Angaben über die Mengenverhältnisse gemacht, die jedoch von ihm selbst als Minimalwerthe bezeichnet werden. Nach dem Verfahren von Hedin hat auch Schulze<sup>3)</sup> das Arginin aus pflanzlichen Eiweisskörpern dargestellt und gefunden, dass die Eiweisssubstanz aus den Samen von *Picea excelsa* soviel Arginin liefert, dass 20,7% ihres Stickstoffs in dieser Form abgespalten werden. 100 Theile dieser Proteinsubstanz liefern mehr als 10 Theile Arginin. Ungefähr ebenso gross war die Ausbeute aus einer Proteinsubstanz des Samens von *Abies pectinata*. Etwa  $\frac{2}{3}$  des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs entfallen auf Arginin. Diese Ergebnisse würden den betreffenden pflanzlichen Eiweissstoffen in obiger Tabelle einen Platz zwischen den Histonen und dem Leim anweisen.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 320.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 155.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 276, Bd. XXV, S. 360.

	Procente des Gesamt-Stickstoffs				Gewichtsprocente				
	Histidin	Arginin	Lysin	Ammoniak	Histidin	Arginin	Lysin	Ammoniak	
Salmin . . . . .	0	87,8	0	0	0	84,3	0	0	Amidovaleriansäure.
Clupein (Mittel) . . . .	0	83,5	0	0	0	82,2	0	0	
Cyclopterin . . . . .	0	67,7	0	?	0	62,5	0	Nicht gewägt	8,3% Tyrosin.
Sturin . . . . .	11,8	63,5	8,4	0	12,9	58,2	12,0	0	
Histon (Thymus) . . . .	1,79	25,17	8,04	7,46	1,21	14,86	7,7	1,66	Spaltung durch Schwefelsäure. Den Stickstoffgehalt zu 18,12% angenommen.
Histon (Fischhoden) . .	3,3	26,9	8,5	3,3	2,34	15,52	8,30	0,74	
Leim (Handelsgelatine) .	Nicht bestimmt	16,6	Nicht bestimmt	1,4	Verdauungs-Menge gering	9,3	Ungewägt 2,16	0,3	Spaltung durch Schwefelsäure.
Glutencasein (Mittel) . .	1,9	8,7	2,5	12,5	1,16	4,4	Prozent 2,16	2,45	
Glutenfibrin . . . . .	2,43	5,75	0	18,78	1,53	3,05	0	3,89	Spaltung durch Schwefelsäure.
Mucedin . . . . .	0,69	5,99	0	20,70	0,43	3,13	0	4,23	
Gliadin . . . . .	1,89	5,12	0	19,51	1,20	2,75	0	4,1	Spaltung durch Schwefelsäure.
Zein . . . . .	1,41	3,76	0	13,53	0,81	1,82	0	2,56	

Wir können die Bindungsweise des Stickstoffs in den Eiweisskörpern in folgender Weise eintheilen.

1. Die harnstoffbildende Gruppe (mit Diamidovaleriansäure vereinigt im Arginin).

2. Die Gruppe der Diamidosäuren (Diamidovaleriansäure im Arginin, Diamidocaprinsäure).

3. Die Gruppe der Monoamidosäuren (Leucin und Homologe, Asparaginsäure und Homologe, Tyrosin, Phenylamidopropionsäure, Amidothiomilchsäure und deren Disulfid.<sup>1)</sup>)

4. Die Ammoniak bildende Gruppe (noch unbekannt).

Hierzu kommt vielleicht noch die huminbildende Gruppe als fünfte hinzu. Die Existenz der letzteren als stickstoffhaltige Gruppe ist aber zweifelhaft, da es möglich ist, dass der Stickstoffgehalt der Huminsubstanzen nur auf einer Nebenreaction beruht.<sup>2)</sup>)

Dass bei der Spaltung mit Säuren ein Theil der Diamidosäuren mit der harnstoffbildenden Gruppe vereinigt als Arginin auftritt, ist eine Thatsache, die vom Standpunkte obiger Eintheilung als eine nebensächliche erscheinen muss. Würde die Spaltung durch Alkali ausgeführt sein, so würden beide Gruppen gesondert erscheinen.

Jede der vier Gruppen muss im Stoffwechsel der Organismen ihre besondere Rolle spielen und da der Gehalt der Eiweisskörper an diesen Gruppen nach unsern Untersuchungen ein sehr verschiedener ist, so wird man hieraus auf eine verschiedene physiologische Werthigkeit verschiedener Eiweissarten schliessen müssen. Vom physiologischen Standpunkt aus ist es besonders interessant, den Gehalt der verschiedenen Eiweisskörper an der harnstoffbildenden Gruppe festzustellen oder aus unsern Untersuchungen zu berechnen, wie viel Harnstoff aus jedem der oben genannten Eiweisskörper durch blosse Spaltung hervorgehen kann. Die Resultate dieser Be-

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 595.

2) Nach Udransky (diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 42 u. f.) können die Huminsubstanzen im Momente ihrer Entstehung Ammoniak aufnehmen.

rechnung sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt, bei deren Verwerthung übrigens nicht übersehen werden darf, dass sie nur die bis jetzt thatsächlich gefundenen Mengen Harnstoff und Diamidosäure-Stickstoff darstellt. Es ist die Möglichkeit nicht auszuschliessen, dass diese Mengen in Wirklichkeit etwas grösser sind und dass bei Verfeinerung unserer Methoden noch weitere harnstoffbildende Gruppen oder Diamidosäuren aufgefunden werden. Speciell gilt dies bezüglich des Histidins, dessen Constitution noch unbekannt, dessen Menge aber auch bei den meisten Eiweisskörpern sehr gering ist. Ferner wird man mit dem Vorkommen der von Drechsel beim Casein aufgefundenen Diamidoessigsäure zu rechnen haben.

	100 g der betreffenden Eiweissubstanz liefern an Harnstoff durch Spaltung g	Procente des Gesamtstickstoffs	
		in der Harnstoffgruppe	in der Diamidosäure- gruppe
Salmin . . . . .	29,1	43,9	43,9
Clupein . . . . .	28,4	41,8	41,8
Cyclopterin . . . . .	21,5	33,8	33,8
Sturin . . . . .	20,1	21,7	(30,1)
Histon (Thymus) . . . .	5,0	12,6	20,5
Histon (Kabeljau-Testikel)	5,3	13,5	22,0
Leim . . . . .	3,2	8,3	Nicht bestimmt
Glutencasein . . . . .	1,5	4,4	6,9
Glutensfibrin . . . . .	1,0	2,9	2,9
Mucedin . . . . .	1,1	3,0	3,0
Gliadin . . . . .	1,0	2,5	2,5
Zein . . . . .	0,9	1,9	1,9

Die vorliegende Tabelle zeigt, dass der Organismus verschiedenartige chemische Leistungen zu vollziehen hat, wenn er aus den gleichen Mengen Stickstoff des einen oder des anderen Eiweisskörpers Harnstoff bildet. Im Histon ist bereits 13—14% des Stickstoffs in solcher Form vorhanden, dass derselbe durch blosse Hydratation in Harnstoff übergeht, im Zein oder in gewissen Eiweissstoffen des Weizenklebers muss fast die ganze Menge des Harnstoffs aus Monoamidosäuren

und aus der uns noch unbekannten ammoniakbildenden Gruppe  
bereitet werden.

### III.

Durch unsere Analysen wird die von A. Kossel ausgesprochene Auffassung der Protamine als der einfachsten Eiweisskörper bestätigt. Besonders werthvoll ist in dieser Hinsicht die Auffindung eines tyrosinbildenden Protamins, des Cyclopterins, welches seine Verwandtschaft mit den Eiweisskörpern durch zwei charakteristische Reactionen: die Biuret-reaction und die Millon'sche Reaction auch äusserlich verräth. Das Cyclopterin zeigt also einerseits seine nahen Beziehungen zum Eiweiss sehr deutlich, kann aber andererseits nicht von den Protaminen getrennt werden. Ein durchgreifender qualitativer Unterschied zwischen Protaminen und complexen Eiweissstoffen in Bezug auf die Constitution ergibt sich aus den bisherigen Beobachtungen nicht, da die ammoniakbildende Gruppe und der Schwefelgehalt, die den Protaminen fehlen, bei gewissen Eiweissstoffen ebenfalls auf ein Minimum herabsinken.

### IV.

Die Histone sind von den übrigen Eiweissstoffen im Wesentlichen durch zwei Eigenschaften ausgezeichnet, die sich offenbar gegenseitig bedingen, nämlich durch ihren hohen Gehalt an Hexonbasen und durch die basische Eigenschaft des ganzen Moleküls. Letztere steht wiederum in engem Zusammenhang mit der Fällbarkeit durch Ammoniak, welche von A. Kossel bei der Aufstellung dieser Eiweissgruppe als charakteristisches Merkmal angeführt worden ist.<sup>1)</sup> Die basischen Eigenschaften bewirken auch, dass die Histone mit gewissen eiweissfällenden Säuren auch dann Verbindungen eingehen, wenn eine Base zugegen ist.

Die Erklärung dieser zuerst von A. Kossel<sup>2)</sup> für basische

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 511.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 168, vgl. auch Mathews. Diese Zeitschrift, Bd. 23, S. 402; später hat Bang diese Reactionen bei den Histonen noch einmal hervorgehoben (diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 463).

Eiweisskörper angegebenen Reaction ist eine sehr naheliegende. Ein Eiweisskörper wird im Stande sein, sich mit Ferrocyankalium in neutraler Lösung umzusetzen, wenn er hinreichende basische Eigenschaften besitzt, um das Kalium aus der Verbindung mit Ferrocyanwasserstoffsäure zunächst theilweise zu verdrängen. Stehen dem Eiweisskörper nicht genügende basische Eigenschaften zur Verfügung, so wird die Umsetzung nur dann stattfinden, wenn eine andere Säure, etwa Essigsäure, zugegen ist, die sich an der Bindung des Kaliums theilweilig oder die — wie Cohnheim und Krieger neuerdings hervor gehoben haben<sup>1)</sup> — das Eiweiss nach Art einer Pseudobase im Sinne von Hantzsch umwandelt. Da die Protamine und Histone ausgeprägt basische Eigenschaften besitzen, so wird hiernach verständlich, dass diese Stoffe in neutraler und sogar in schwach alkalischer Lösung durch phosphorwolframsaures, wolframsaures, pikrinsaures, chromsaures, ferrocyanwasserstoffsaures Alkali gefällt werden, während diese Fällung bei den nicht basischen Eiweisskörpern nur bei Gegenwart freier Säure eintritt.

Der hohe Gehalt der Histone an basischen Spaltungsprodukten tritt auch beim Vergleich mit anderen als den oben erwähnten Eiweisskörpern hervor. Die folgende Tabelle gibt die Resultate einer Anzahl Analysen wieder, die in folgender Weise gemacht waren. Nachdem die Eiweisskörper durch Spaltung mit Schwefelsäure oder Salzsäure zerlegt waren, wurde (nöthigenfalls nach Entfernung des grössten Theils der Salzsäure durch Eindampfen u. s. w.) das Ammoniak — wie oben angegeben — vertrieben und zugleich quantitativ bestimmt. Hierauf wurde durch Baryt und Silbersulfat ein Niederschlag erzeugt, welcher das Arginin und Histidin enthalten musste. Der Stickstoffgehalt dieses Niederschlages kann zwar nicht direkt als Ausdruck für die Menge der beiden genannten Hexonbasen betrachtet werden, denn die oben angeführten Tabellen (S. 185—197) ergeben, dass stets noch eine gewisse Menge anderer stickstoffhaltiger Substanz mit gefällt wird, jedoch ist es zulässig, diese Zahlen einer vergleichenden

---

1) Zeitschrift für Biologie, Bd. 40, N. F. Bd. 22, S. 95.

Betrachtung zu Grunde zu legen, und dann ergibt sich dasselbe Resultat, welches schon aus der Tabelle S. 207 hervorgeht: die Masse der basischen Produkte ist in den Histonen eine grössere als in den übrigen bisher untersuchten complexen Eiweisskörpern.

	Procente des Gesamtstickstoffs		Spaltungs- verfahren
	Stickstoff des Silber- niederschlags	Stickstoff des Ammoniaks	
Histon . . . . .	30,7—35,5	4—7,5	4 Versuche, z. Th. Schwefelsäure z. Th. Salzsäure
Fibrinpepton . . . . .	20	10	Salzsäure 72 Stunden
Eieralbumin . . . . .	18,7	11	Salzsäure
Casein . . . . .	14,6	9,1	Schwefelsäure
Casein . . . . .	16,4	12,9	Salzsäure
Parahiston <sup>1)</sup> . . . . .	11,7	Nicht bestimmt	

## V.

Ein auffallendes Ergebniss unserer Untersuchungen ist das Fehlen des Lysins unter den Spaltungsprodukten der alkohollöslichen Eiweisskörper des Weizenmehls und des Maismehls. Hier treffen wir also wiederum auf eine eigenartige, scharf umschriebene Gruppe von Eiweisssubstanzen, die wahrscheinlich in grösserer Verbreitung im Pflanzenreich auftreten. Neben den lysinfreien Eiweissstoffen findet sich im Weizenmehl ein lysinhaltiger, das Glutencasein. Diese Versuche bestätigen die früheren Angaben von Ritthausen<sup>2)</sup> über die Zusammensetzung des Weizenklebers. Freilich ergibt sich aus unseren Untersuchungen mit Sicherheit nur das Vorhandensein von zwei verschiedenen Eiweissarten. Die Differenzen in der Zusammensetzung der alkohollöslichen Eiweisskörper sind wenigstens nur sehr geringe. Die Arbeiten von Morishima,<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> Nach einem Versuch des Herrn A. Ascoli. Hiernach gehört das Parahiston Fleroff's (diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 307) nicht zur Histongruppe.

<sup>2)</sup> Ritthausen, l. c. und Journ. f. pract. Chemie [2] 50, 474.

<sup>3)</sup> Morishima, Archiv f. experim. Pathologie und Pharmakologie, Bd. 41, S. 291.

welcher die Eintheilung der Weizenkleberproteinstoffe nach Ritthausen verwarf und zu dem Ergebniss kam, dass im Weizenmehl nur ein Eiweissstoff, das «Artolin», enthalten sei, beruhen also auf einem Irrthum. Die Auffindung der lysin-freien Eiweisskörper eröffnet neue Fragen auf dem Gebiete der Ernährungslehre. Man wird die Rolle dieser Eiweissstoffe im Stoffwechsel untersuchen müssen, um festzustellen, ob die beiden verschiedenartigen Bestandtheile unseres Brotes die gleiche oder verschiedene Bedeutung für Ansatz und Umsatz besitzen.

## VI.

Auf die Gründe, welche uns veranlassen, die Protamine als die einfachsten Eiweisskörper zu betrachten, haben wir schon mehrfach hingewiesen. Diese Auffassung bringt es mit sich, dass wir die in den Protaminen vorhandene Atomverkettung auch zur Grundlage unserer Anschauungen über die Constitution des Eiweissmoleküls machen. Was wir von dieser Atomverkettung kennen, ist die Vereinigung der harnstoffbildenden Gruppe mit der Diamidoveriansäure im Arginin und diese Gruppe mit 6 Kohlenstoffatomen ist bisher bei keinem Eiweisskörper vermisst worden, wo sie aufgesucht worden ist.

Neben dem Arginin findet man andere basische Stoffe, die zwar sehr häufig, doch nicht constant auftreten, wie Histidin und Lysin. Ferner bemerken wir schon bei den Protaminen, dass ein kleiner Theil des Stickstoffs in Form von Monoamidosäuren (Amidoveriansäure, Tyrosin) gebunden ist. Gehen wir zu den complexen Eiweisskörpern über, so sehen wir, wie dieser Monamidosaureantheil mehr und mehr wächst. Ferner tritt hier noch die ammoniakbildende und die schwefelhaltige Gruppe hinzu und alle diese verschiedenartigen Gruppen fügen sich an den basischen Antheil wie an einen Kern an.<sup>1)</sup>

Eine weitere Complication wird dadurch geschaffen, dass mehrere derartig aufgebaute Atomgruppen sich mehr oder

---

<sup>1)</sup> Diese Betrachtungsweise würde an Fruchtbarkeit auch dann nicht verlieren, wenn es gelingen sollte, Körper eiweissähnlichen Charakters ohne Argininkern oder Diamidogruppe aufzufinden.



wenigstens mit einander zu grösseren Complexen vereinigen. Die Spaltung der Eiweisskörper in mehrere nebeneinander entstehende peptonartige Complexe ist kaum anders zu erklären, als durch die Auffassung des Eiweissmoleküls als Zusammenlagerung einer gewissen Anzahl von Gruppen, die alle nach einem ähnlichen Typus gebaut sind. Dass sich solche Zusammenlagerungen auch ausserhalb des Körpers leicht vollziehen, ist durch verschiedene Beobachtungen bei einfachen und complexen Eiweissgruppen sicher gestellt. Wir verweisen auf die Anlagerung der Protamine<sup>1)</sup> und Histone<sup>2)</sup> an Eiweiss, auf die Vereinigung von Propeptonen mit Globulinen,<sup>3)</sup> von Fibrinogen mit den Eiweissstoffen des Blutserums.<sup>4)</sup>

---

### Nachtrag.

#### Bildung der Glutaminsäure aus Spongin.

In einem Fall verarbeiteten wir das mit concentrirter Salzsäure zersetzte Spongin so, dass wir die Hexonbasen mit Phosphorwolframsäure ausfällten, das Filtrat mit Baryt von überschüssiger Phosphorwolframsäure befreiten und allen Baryt genau durch Schwefelsäure entfernten. Aus der restirenden Zersetzungsflüssigkeit schieden wir darauf nach dem Verfahren von Hlasiwetz und Habermann<sup>5)</sup> die Glutaminsäure in Form ihrer salzsauren Verbindung ab. Wir erhielten aus ca. 100 g lufttrockenen Spongins annähernd 15 g analysenreine salzsaure Glutaminsäure.

Es gaben 0,2507 g Substanz 0,1932 g AgCl.

Für  $C_8H_9NO_4 \cdot HCl$ .

Berechnet:  
Cl = 19,3 %

Gefunden:  
Cl = 19,05 %.

---

1) Kossel, Deutsche medicinische Wochenschrift. 1894, S. 147.

2) Mathews, Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 402.

Bang, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 463.

3) Kutscher, Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 115.

4) Hammarsten, Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 333.

5) Liebig's Annalen. Bd. 169.

---

# **Ueber die Verwendung der Phosphorwolframsäure bei quantitativen Bestimmungen der Spaltungsprodukte des Eiweisses.**

Von  
**Fr. Kutscher.**

---

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)  
(Der Redaction zugegangen am 20. September 1900.)

---

In letzter Zeit ist mehrfach ein Verfahren angewandt worden, welches bezweckt, die Gesamtmenge desjenigen Stickstoffs zu ermitteln, der bei der Eiweisssspaltung im basischen Antheil der Zersetzungsprodukte enthalten ist. Nach dem Vorgange von E. Schulze hat besonders Hausmann<sup>1)</sup> eine Reihe von Bestimmungen ausgeführt, um den Stickstoff der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Zersetzungsprodukte verschiedener Eiweisskörper festzustellen. Dieser Stickstoff wird von Hausmann auf den basischen Antheil des Moleküls bezogen und als Diaminostickstoff dem Ammoniakstickstoff und dem Monoaminostickstoff der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Stoffe gegenübergestellt.

Da die sehr handliche Methode Hausmann's eine schnelle vorläufige Orientirung über den auf die Summe der Hexonbasen entfallenden Stickstoff in den zur Untersuchung verwandten Eiweisskörpern gestattet hätte, habe ich eine Nachprüfung der Methode unternommen.

Diese Nachuntersuchung war um so nothwendiger, als die Zahlenangaben Hausmann's<sup>2)</sup> sehr wesentlich von älteren, durch Fr. Müller und Seemann<sup>3)</sup> publicirten, von Kossel und mir ausgeführten Bestimmungen, die sich mit der Vertheilung des Stickstoffs im Eiweiss beschäftigten, abwichen. Ich gebe in nachstehender Tabelle diese Bestimmungen wieder

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 95 und Bd. XXIX, S. 136.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 143.

<sup>3)</sup> Deutsche medicinische Wochenschrift. 1899. Nr. 13.

und Tage nicht zum Vergleich des entsprechenden Hausmann's an.

	Amid- stick- stoff %	Dia- mino- stick- stoff %	Mono- amino- stick- stoff %	Stick- stoff in Summe ge- funden statt 100 %	Bemerkungen
Casein Merck	13,37	11,71	75,98	101,06	Versuch von Hausmann.
Casein	—	23,0	53,7	—	Versuch von Kossel und Kutscher.
Krystallisirtes Eialbumin	8,53	21,33	67,80	97,66	Versuch von Hausmann.
Eialbumin	—	27,0	50,4	—	Das benutzte Eialbumin war von mir sorgfältig gereinigt und frei von Globulin und Ovomuroid. Versuch von Kossel und Kutscher.

Weiter stelle ich die Zahlen, die von Wetzel für den Amidstickstoff und Diaminostickstoff des Leim angegeben werden, denjenigen gegenüber, die von Hausmann an dem gleichen Material erhalten wurden.

	Amidstickstoff:	Diaminostickstoff:
Analyse 1.) Leim	1,76	18,85
„ 2.) „	1,61	35,83.

Auch diese beiden Analysen zeigen sehr starke Differenzen, die von Wetzel bereits richtig erklärt sind, indem derselbe die Unzulänglichkeit der Phosphorwolframfällung hervorhebt.

Beim Beginn meiner Arbeit fiel mir nun auf, dass die Angaben Hausmann's in einigen wichtigen Punkten nicht eingehend genug sind, um eine genaue Wiederholung zu ermöglichen. So gibt Hausmann nicht an, wie weit er die durch Destillation mit Magnesia vom Ammoniak befreite Zersetzungsfüssigkeit concentrirte, ehe er sie mit Phosphorwolframsäure fällte. Das Experiment, welches das Fehlen dieser

1) Analyse 1 ist von Wetzel in dieser Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 404 veröffentlicht.

2) Analyse 2 stammt von Hausmann.

Angabe erklärt, führt Hausmann in seiner zweiten Arbeit über die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül an.<sup>1)</sup> Ich gebe dasselbe mit den Worten des Verfassers wieder: «Ich habe weiter, um mich zu unterrichten, ob die quantitative Ausfällung der Diaminosäuren mit Phosphorwolframsäure aus der durch Destillation mit Magnesia vom Aminostickstoff befreiten salzsauren Zerkochungsflüssigkeit von der Concentration der letzteren beeinflusst wurde, Parallelversuche der Art angestellt, dass ich die Ausfällung 1. aus sehr concentrirter, 2. aus der auf das doppelte Volumen verdünnten Lösung vornahm. Ich habe dabei einen Einfluss der verschiedenen Concentration nicht beobachtet.»<sup>2)</sup>

Dieses Resultat ist sehr überraschend und steht im Widerspruch mit den sorgfältigen Untersuchungen von Gulewitsch,<sup>3)</sup> nach denen dem phosphorwolframsauren Arginin eine gewisse Löslichkeit zukommt. Wie sehr diese Löslichkeit in Betracht zu ziehen ist, ergibt sich aus folgendem Beispiel.

Ich will annehmen, man hätte 1,0 g Zein, das sehr arm an Arginin ist, zersetzt, das Ammoniak ausgetrieben, die salzsaure Zersetzungsflüssigkeit auf 100 ccm. eingeeengt und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Es würden dann gemäss den Angaben von Gulewitsch<sup>4)</sup> 0,007 g Arginin in Lösung bleiben. Würde man dagegen die Zersetzungsflüssigkeit auf 200 ccm. eingeeengt und dann gefällt haben, so würden 0,014 g Arginin nicht zur Fällung kommen d. h. man würde, da 1,0 g Zein nur 0,0182 g Arginin liefert, den kleinsten Theil des wirklich vorhandenen Arginins bestimmen. Würde man die Zersetzungsflüssigkeit noch um weitere 100 ccm. verdünnen, so würde man überhaupt kein Arginin mehr fällen und sich der Täuschung hingeben, einen argininfreien Eiweisskörper in Händen zu haben.

Ein weiterer Umstand, der die quantitativen Bestimmungen nach Hausmann beeinflussen muss, und den Haus-

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. 29, S. 138 und 139.

2) Im Original nicht gesperrt gedruckt.

3) Diese Zeitschrift, Bd. 27, S. 196.

4) l. C.

man gar nicht in Betracht zieht, ist das Verhalten der Diaminosäuren und der übrigen Zersetzungsprodukte gegenüber der Phosphorwolframsäure. Ich muss daher auf dieses etwas näher eingehen. Arbeitet man mit reinen Diaminosäuren, so macht ihre Ausfällung durch Phosphorwolframsäure keine sonderliche Schwierigkeit, da man das Ende der Fällung ziemlich scharf eintreten sieht, doch ist ein wesentlicher Ueberschuss des Fällungsmittels zu vermeiden, da in demselben die Phosphorwolframverbindungen der Diaminosäuren leicht löslich sind. Schwieriger gestalten sich die Verhältnisse, wenn man die Diaminosäuren aus concentrirten Zersetzungsflüssigkeiten der Eiweisskörper durch Phosphorwolframsäure abscheiden will. Hier tritt in der durch Salzsäure oder Schwefelsäure angesäuerten Flüssigkeit auf Zugabe von Phosphorwolframsäure zunächst sofort ein reichlicher, amorpher, körniger Niederschlag auf. Nach einiger Zeit aber erscheint der Niederschlag nicht mehr momentan, sondern erst nach einigen Secunden. Der Zeitraum, in dem noch auf Zusatz von Phosphorwolframsäure Fällung eintritt, verlängert sich allmählich immer mehr und mehr und gleichzeitig ändert sich das Aussehen des Niederschlages, der nicht mehr amorph, sondern gleich krystallinisch sich abscheidet. Dieser krystallinische Niederschlag ist in Wasser, verdünnten Säuren und angesäuerter verdünnter Phosphorwolframsäure leicht löslich und besteht nicht mehr aus den Phosphorwolframverbindungen der Diaminosäuren. Um diese in verdünnter Phosphorwolframsäure leicht löslichen Verbindungen vollkommen abzuschcheiden, braucht man einen mächtigen Ueberschuss an concentrirter Phosphorwolframsäure, in dem sich die Phosphorwolframverbindungen der Diaminosäuren wieder lösen würden. Man kann also, wie aus Vorstehendem ersichtlich ist, wenn man nicht das eigenthümliche Verhalten der Zersetzungsflüssigkeit gegen Phosphorwolframsäure kennt, zu Fällungen gelangen, die überhaupt keine Diaminverbindungen mehr enthalten. Dass dies Verhalten der verschiedenen Phosphorwolframverbindungen bei den Untersuchungen von Hausmann u. s. w. berücksichtigt worden ist, geht aus denselben nicht hervor. Wenigstens erwähnt er nirgends, wie weit er seine Zersetzungsflüssigkeiten

mit Phosphorwolframsäure ausgefällt hat, und ob er beim Auftreten der krystallinisch fallenden, leicht löslichen Phosphorwolframverbindungen mit der Fällung aufgehört habe. Die Natur der von Hausmann durch Phosphorwolframsäure gefällten Verbindungen ist somit nicht erwiesen.

Eine weitere Ursache, welche die quantitativen Bestimmungen Hausmann's beeinflussen muss, ist in der Concentration und Menge des beim Auswaschen des Phosphorwolframniederschlages angewandten Waschwassers, die Hausmann ebenfalls nicht angibt, zu suchen. Denn es ergibt sich aus Vorstehendem, dass, wenn die Waschflüssigkeit reichlich Phosphorwolframsäure enthalten hat und das Volumen der Waschflüssigkeit beträchtlich gewesen ist, beim Auswaschen beträchtliche Mengen der in überschüssiger Phosphorwolframsäure löslichen Diaminverbindungen weggespült werden müssen. Dem scheinen die Kontrollversuche Hausmann's zu widersprechen; es findet sich nämlich in seiner ersten Mittheilung<sup>1)</sup> folgende Bemerkung: «Ich habe in Vergleichsversuchen, wo auf die Bestimmung des Stickstoffs im Filtrat verzichtet wurde, das Auswaschen endgültig durchgeführt, habe aber in Bezug auf Stickstoffgehalt des Phosphorwolframniederschlages keine Differenzen mit nach gewöhnlicher Form ausgeführten Versuchen erhalten.»

Meine im Nachstehenden näher angegebenen Versuche haben allerdings das Gegentheil ergeben.

Zu meinen Versuchen benutzte ich Casein pur. Grübler. Dasselbe besass im lufttrockenen Zustande, wie zwei untereinander stimmende Stickstoffanalysen nach Kjeldahl ergaben, 12,85 % Stickstoff. Die für meine Versuche nothwendigen Caseinmengen waren gleichzeitig mit den zur Stickstoffbestimmung entnommenen Proben abgewogen worden. Ihr Stickstoffgehalt liess sich natürlich leicht berechnen.

Da meine Versuche zu Ergebnissen führten, die von denen Hausmann's stark abweichen, so muss ich auf jeden einzelnen etwas näher eingehen.

Versuch I. Es wurden 1,184 g Casein mit 0,15214 g Stickstoff in Arbeit genommen. Dieselben wurden mit 20 ccm. Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 6 Stunden am Rück-

nusskücher gekocht und aus der Zersetzungsflüssigkeit das abgespaltene Ammoniak nach den Angaben von Hausmann<sup>1)</sup> ausgetrieben. Abgesättigt wurden davon 11,3 ccm. einer  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Dieselben entsprechen 0,01582 g Stickstoff oder 10,40 % des Gesamtstickstoffs.

Die vom Ammoniak befreite, mit Salzsäure angesäuerte Zersetzungsflüssigkeit wurde auf 30 ccm. eingengt und mit Phosphorwolframsäure<sup>2)</sup> gefällt. Ich setzte die Fällung so lange fort, bis sich auf weitere Zugabe von Phosphorwolframsäure erst nach 2—3 Minuten ein neuer Niederschlag zu bilden begann. Derselbe war schon makroskopisch als krystallinisch zu erkennen und in verdünnter Phosphorwolframsäure leicht löslich. Ich hatte, um dies zu erreichen, ca. 50 ccm. Phosphorwolframsäure gebraucht.

Nach 24 Stunden saugte ich den reichlichen Niederschlag auf kleiner Filterplatte<sup>3)</sup> ab. Als Waschflüssigkeit für denselben benutzte ich eine ca. 5%ige Salzsäure, der ich beliebig von der geschilderten Phosphorwolframsäure zugefügt hatte. Das Volumen der gebrauchten Waschflüssigkeit ist nicht gemessen worden. Beim Auswaschen liessen die stark braun gefärbten ersten Antheile des Waschwassers, sobald sie in die Mutterlauge eintropften, einen deutlich krystallinischen Niederschlag fallen. Dieser löste sich im nachfolgenden Waschwasser wieder auf. Trotzdem sich das Auswaschen sehr glatt vollzog und ich schnell den von Hausmann angegebenen Endpunkt d. h. farbloses Abfließen des Waschwassers erreichte, hatte sich doch ein sehr merklicher Theil des auf der Filterplatte befindlichen Niederschlages gelöst. Der Phosphorwolframniederschlag wurde in Natronlauge gelöst, das Ganze auf

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 100.

2) Die Phosphorwolframsäure, welche ich in diesem und den folgenden Versuchen zur Fällung benutzte, war nach Drechsel's Angaben (Berichte der deutsch. chem. Gesellsch. Bd. 20, S. 1452) hergestellt und enthielt in 100 ccm. 31 g feste Phosphorwolframsäure.

3) Es liess sich bei Anwendung einer Filterplatte das Filtrirpapier, das beim Niederschlag verblieb, auf das geringste Maass beschränken. Ausserdem war der Niederschlag und sein Verhalten besser zu übersehen, auch verlief die Filtration und das Auswaschen des Niederschlages schneller.

250 ccm. gebracht und in 50 ccm. davon der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Es wurden von dem gebildeten Ammoniak 7,5 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure abgesättigt. In den 250 ccm. waren demnach 0,0525 g Stickstoff enthalten. Es wären also in diesem Versuche an die «Diaminosäuren» 34,51 % des Gesamtstickstoffs gebunden gewesen.

Das Filtrat von der Phosphorwolframbfällung wurde mit den Waschwassern vereinigt und auf 500 ccm. gebracht. Davon wurden 100 ccm. nach Kjeldahl verascht. Das dabei gebildete Ammoniak sättigte 11,6 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Danach wären an Monoamidosäuren 0,0812 g Stickstoff = 53,37 % des Gesamtstickstoffs gebunden gewesen.

Versuch II sollte als Kontrollversuch dienen. In Arbeit wurden 1,1058 g Casein mit 0,1421 g Stickstoff genommen. Das Casein wurde mit 20 ccm. Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 während 6 Stunden gekocht, das Ammoniak mit Magnesia ausgetrieben, die Zersetzungsflüssigkeit danach mit Salzsäure angesäuert, auf 27 ccm. gebracht und wie in Versuch I mit Phosphorwolframsäure gefällt. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abgesaugt. Beim Auswaschen desselben verstopfte sich jedoch das Filter, so dass die Filtration nur sehr langsam von statten ging und das Waschwasser in Folge dessen sehr lange Zeit auf den Niederschlag einwirken konnte. Dabei hatte sich, bis ich zum farblos ablaufenden Waschwasser kam, der grösste Theil des Niederschlages gelöst. Das Volumen des Waschwassers sowie seinen Gehalt an Phosphorwolframsäure und Salzsäure habe ich nicht bestimmt. Weil sich in diesem Versuch ein so grosser Theil des Phosphorwolframbniederschlags beim Auswaschen gelöst hatte, weichen die Zahlen, die ich für den an Diamino- und Monoamidosäuren gebundenen Stickstoff erhielt, wesentlich von den in Versuch I erhaltenen ab.

Es wurden in diesem Versuch abgesättigt durch das bei der hydrolytischen Spaltung freigewordene und bei der Destillation mit Magnesia ausgetriebene Ammoniak 10,5 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Dieselben entsprechen 0,0147 g Stickstoff oder 10,35 % des Gesamtstickstoffs.

Die Phosphorwolframbfällung wurde in Natronlauge gelöst



und auf 250 ccm. gebracht. 50 ccm. sättigen, nach Kjeldahl behandelt, 4,2 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Demnach war an Diaminosäuren 0,0294 g Stickstoff gleich 20,69 % des Gesamtstickstoffs gebunden.

Das Filtrat der Phosphorwolframbfällung sammt Waschwasser wird auf 500 ccm. gebracht. 100 ccm. davon nach Kjeldahl verascht sättigen 14,1 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Demnach wären 0,0987 g Stickstoff gleich 69,42 % des Gesamtstickstoffs an Monoaminosäuren gebunden gewesen.

In den nächsten Versuchen, in denen ich, um gleichmässige Resultate zu erzielen, alle Versuchsbedingungen genau bestimmte und innehielt, habe ich mich bemüht, den Stickstoff der Huminsubstanzen, die in den Phosphorwolframniederschlag mit eingehen, festzustellen.

Versuch III. Es wurden verwandt 1,1088 g Casein mit 0,1425 g Stickstoff. Dieselben wurden mit 20 ccm. Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,19 während 6 Stunden gekocht. Das abgespaltene Ammoniak wurde nach Hausmann's Angaben bestimmt. Die ammoniakfreie mit Salzsäure übersättigte Flüssigkeit wurde auf 20 ccm. eingedampft und mit 24 ccm. Phosphorwolframlösung gefällt. Ich erreichte damit gerade, dass die letzten, erst allmählich auftretenden Fällungen bereits krystallinisch sich abschieden. Der entstandene Niederschlag wurde nach 24 Stunden abgesaugt und mit einem Waschwasser, das in 100 ccm. 6,1 g feste Phosphorwolframsäure und 1,86 g Salzsäure enthielt, nachgewaschen, bis das Filtrat farblos ablief. Es wurden 125 ccm. Waschwasser gebraucht. Auch in diesem Fall, wo ich auf das Wichtigste mit Phosphorwolframsäure gefällt hatte, färbte sich das zuerst ablaufende Waschwasser tief braun und liess beim Eintropfen in die Mutterlauge einen starken krystallinischen Niederschlag fallen. Während des Auswaschens war ein bedeutender Theil des auf der Filterplatte befindlichen Niederschlages in Lösung gegangen. Der verbliebene Rest wurde in ein Becherglas gespült, in ca. 300 ccm. Wasser fein vertheilt und das Ganze zum Sieden erhitzt. Die siedende Flüssigkeit wurde so lange mit kalt gesättigtem Barytwasser versetzt, bis eine Probe mit Natriumcarbonat eine Fällung gab.

Das gebildete phosphorwolframsaure Baryum, das die färbenden, im gewaschenen Phosphorwolframniederschlag verbliebenen Huminsubstanzen vollkommen niedergerissen hatte, wurde auf kleiner Filterplatte abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen, darauf in das Becherglas zurückgebracht und hier mit 300 ccm. Wasser ausgekocht und von Neuem abgesaugt. Das Auskochen etc. des phosphorwolframsauren Baryts wurde noch zweimal wiederholt. Das erste die freien Basen enthaltende Filtrat und die Flüssigkeiten, mit denen der phosphorwolframsaure Baryt ausgekocht war, waren farblos. Sie wurden mit Schwefelsäure angesäuert, auf ein kleines Volumen eingengt. Vom abgeschiedenen schwefelsauren Baryt wurde abfiltrirt, das Filtrat auf 500 ccm. gebracht. 100 ccm. davon wurden nach Kjeldahl verascht. Das gebildete Ammoniak sättigte 5,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Es war demnach in diesem Versuch 0,035 g Stickstoff gleich 24,56% des Gesamtstickstoffs an Diaminosäuren gebunden gewesen.

Der phosphorwolframsaure Baryt wurde mitsammt den Filterresten ebenfalls nach Kjeldahl behandelt. Das gebildete Ammoniak sättigte 1,6 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure ab. Demnach enthielt die im Phosphorwolframniederschlag verbliebene Huminsubstanz 0,00224 g Stickstoff gleich 1,57% des Gesamtstickstoffs, was ca. 6% des in diesem Versuch gefundenen Diaminostickstoffs entsprechen würde. Wäre damit schon der Stickstoff der gesamten Huminsubstanzen bestimmt, so würde der Fehler, den man durch seine Vernachlässigung macht, um ein Vielfaches den von Hausmann für Melanoidinsäure berechneten übertreffen. In Wirklichkeit ist der Stickstoff, der an «Huminsubstanzen»<sup>1)</sup> gebunden ist, noch viel grösser, wie aus der Arbeit von Kossel und mir hervorgeht. Dass man die Huminsubstanzen nur zum kleineren Theil in dem Phosphorwolframniederschlag behält, wenn man nach der Methode von Hausmann vorgeht, liegt daran, weil man ihre Phosphorwolframverbindungen wieder beim Auswaschen löst; darauf weist die starke Braunfärbung der ersten Waschwässer. Natürlich entgeht der Rest des an die Huminsubstanzen gebundenen Stick-

<sup>1)</sup> Ich benutze hier die Bezeichnung Huminsubstanz in dem Sinne, welcher in der vorhergehenden Arbeit erörtert worden ist.

stons der Bestimmung nach der Häusmann'schen Methode nicht, nur bestimmt man ihn als Monoaminostickstoff und führt damit einen Fehler unbekannter Grösse ein.

Das Filtrat vom Phosphorwolframniederschlag der Diaminosäuren wurde auf 500 ccm. gebracht. Davon sättigen 100 ccm., nach Kjeldahl behandelt, 13,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Demnach waren bei diesem Versuch 0,091 g Stickstoff gleich 63,87% des Gesamtstickstoffs als Monoaminostickstoff gefunden.

Das durch Magnesia aus der Zersetzungsflüssigkeit austreibbare Ammoniak sättigte 10,3 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Das entspricht 0,01442 g Stickstoff gleich 10,12% des Gesamtstickstoffs.

In Versuch IV wurden die in Versuch III festgestellten Bedingungen peinlich innegehalten. 1,1968 g Casein mit 0,1538 g Stickstoff wurden mit 20 ccm. Salzsäure vom spezifischen Gewicht 1,19 während 6 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Das abgespaltene Ammoniak wurde mit Magnesia ausgetrieben. Es sättigte 11,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Das entspricht 0,0154 g Stickstoff gleich 10,02% des Gesamtstickstoffs. Die ammoniakfreie, mit Salzsäure übersättigte Flüssigkeit wird auf 22 ccm. gebracht und mit der berechneten Menge (26,0 ccm.) Phosphorwolframsäure gefällt. Die Fällung wird abgesaugt und mit 140 ccm. des auch in Versuch III benutzten Waschwassers ausgewaschen. Im Uebrigen wird genau wie in Versuch III zur Bestimmung des Huminstickstoffs etc. verfahren. Die in Versuch III angeführten auffälligen Erscheinungen (beträchtliches Lösen des Phosphorwolframniederschlags beim Auswaschen etc.) traten ebenfalls ein.

Es ergaben sich in diesem Versuch folgende Zahlen für den Huminstickstoff etc.:

Das aus den im phosphorwolframsauren Baryt steckenden Huminsubstanzen entwickelte Ammoniak sättigte 1,5 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Das entspricht 0,002149 g Stickstoff gleich 1,34% des Gesamtsickstoffs.

Die in Freiheit gesetzten Diaminosäuren waren in 500 ccm. schwefelsaurem Wasser gelöst. 100 ccm. davon, nach Kjeldahl behandelt, sättigen 5,5 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Das

entspricht 0,0385 g Stickstoff gleich 25,03% des Gesamtstickstoffs.

Das Filtrat von den Phosphorwolframverbindungen wurde auf 500 ccm. gebracht. 100 ccm. sättigen, nach Kjeldahl behandelt, 14,5 ccm.  $\frac{1}{10}$  Normaloxalsäure. Das entspricht 0,1015 g Stickstoff gleich 66,0% des Gesamtstickstoffs.

In nachfolgender Tabelle gebe ich, der besseren Uebersicht wegen, die von mir in den verschiedenen Versuchen erhaltenen Werthe wieder. Des Vergleiches halber stelle ich an den Kopf der Tabelle die von Hausmann für Casein angegebenen Zahlen.

	Amid- stickstoff %	Diamino- stickstoff %	Monoamino- stickstoff %	Humin- stickstoff im Nieder- schlag %	Stickstoff in Summe gefunden statt 100 %	Bemerkungen
Casein	13,37	11,71	75,98	—	101,06	Vermuth Hausmann.
„	10,40	34,51	53,37	—	98,28	Versuch I.
„	10,35	20,69	69,47	—	100,51	Versuch II.
„	10,12	24,56	63,87	1,57	100,12	Versuch III.
„	10,02	25,03	66,00	1,34	102,39	Versuch IV.

Auf weitere Versuche habe ich verzichtet. Die quantitativen Bestimmungen Hausmann's können nicht mehr als massgebend betrachtet werden, nachdem sich gezeigt hat, dass die Angaben Hausmann's bezüglich der Unlöslichkeit des Phosphorwolframsäureniederschlags nicht zutreffend sind und der Phosphorwolframniederschlag, der die Diaminosäuren enthalten soll, sich auch bei vorsichtigster Ausfällung der Diaminosäuren in dem Waschwasser merklich löst, ehe man den von Hausmann angegebenen Endpunkt für das Auswaschen erreicht. Das eben Gesagte gilt auch von den Bestimmungen, die letzter Zeit von Pick, Magnus-Levy etc. über die Verteilung des Stickstoffs im Eiweiss mittelst der Hausmann'schen Methode gemacht worden sind.

Eine weitere sehr beträchtliche Ungenauigkeit der Hausmann'schen Methode ist bedingt durch die Nichtbeachtung

des Huminstickstoffs. Derselbe kann, wie ich bereits erwähnt habe, bei den Eiweisskörpern ca. 10% des Gesamtstickstoffs ausmachen. Nach der Hausmann'schen Methode aber muss der Huminstickstoff als Diamino- und Monoaminostickstoff bestimmt werden und die Zahlen dafür merklich beeinflussen.

Zum Schluss möchte ich noch kurz die Frage erörtern, ob Monoamidosäuren durch Phosphorwolframsäure gefällt werden oder nicht. Es liegen hierüber Kontrollversuche von Hausmann<sup>1)</sup> vor. Er prüfte die Fällbarkeit der Monoamidosäuren durch Phosphorwolframsäure in verdünnter saurer Lösung und erhielt durchweg nur negative Resultate. Diese Kontrollversuche sind nicht beweisend, denn man ist gezwungen, um eine möglichst vollständige Abscheidung der Diaminosäuren durch Phosphorwolframsäure zu erhalten, die Zersetzungsflüssigkeiten, so weit es nur angängig ist, zu concentriren. Man arbeitet daher bei quantitativen Bestimmungen der Zersetzungsprodukte nicht mit verdünnten, sondern mit concentrirten resp. übersättigten Lösungen der Monoamidosäuren. Hätte Hausmann diese Kontrollversuche, den wirklichen Bedingungen entsprechend, an concentrirten Zersetzungsflüssigkeiten vorgenommen, dann wäre das Resultat ein anderes gewesen. Er hätte dann jedenfalls die Angaben zuverlässiger Beobachter,<sup>1)</sup> nach denen in den Phosphorwolframniederschlag ausser den Diaminosäuren alle möglichen Substanzen eingehen, bestätigen können.

Fasse ich die Resultate meiner Arbeit kurz zusammen, so ergibt sich, dass die Methode, nach der Hausmann die Vertheilung des Stickstoffs im Eiweissmolekül bestimmt, keine zuverlässigen Werthe liefern kann.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 138.

<sup>2)</sup> Siehe die Arbeit Kossel's: «Ueber die Bildung von Thymin aus Fischsperma». Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 188 und Hedin's Arbeit: «Einige Bemerkungen über die basischen Spaltungsprodukte des Elastins.». Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 346.

# **Zur Kenntniss der pflanzlichen Oxydasen.**

Von

**Dr. B. Slowtzoff.**

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium der St. Petersburger militär-  
medizinischen Akademie.)

(Der Redaction zugegangen am 11. October 1900.)

---

Bei der Untersuchung der Oxydationsvorgänge in den thierischen und pflanzlichen Organismen fand man eine Reihe organischer Substanzen, die den Sauerstoff auf andere chemische Verbindungen auch in vitro übertragen können; so theilte Schönbein schon im Jahre 1848 mit, dass verschiedene frische thierische Gewebe und die Säfte vieler Pflanzen Wasserstoffsuperoxyd zerlegen und Guajactinctur blau färben, dass sie aber diese Fähigkeiten durch Kochen verlieren. Diese Erscheinung blieb lange ohne Erklärung, bis Bertrand,<sup>1)</sup> der die Versuche des japanischen Chemikers Hikorokuro Yoshida<sup>2)</sup> wiederholte, fand, dass man auch aus dem Harz des Lackbaums eine Substanz isoliren kann, die einen andern Bestandtheil des Lackbaumharzes, das Laccol, energisch oxydirt. Doch werden viele andere Körper, wie Hydrochinon, Pyrogallol, Guajacolsäure, einige Polyphenole und Oxyhydrate der Phenole, auch einige Aether und Amine der aromatischen Reihe durch die von Bertrand entdeckte Substanz oxydirt; sie wurde Laccase genannt und kann als Typus eines oxydirenden Fermentes gelten. Die Oxydation geht am besten bei neutraler, aber auch bei schwach saurer Reaction vor sich, 50%iger Aethyl- oder Methylalkohol ist ohne Einfluss auf den Ablauf derselben.

Bertrand<sup>3)</sup> konnte 3 Präparate von Laccase darstellen; das erste, aus dem Harze des Lackbaums gewonnen, war aber nicht rein. Es enthielt ungefähr 86,77% Gummi (Araban und Galactan), 7,40% Wasser (durch Trocknen bei 120° bestimmt), 5,58% an Mangan reiche Asche und etwa 2,5% Eiweiss, nach dem Stickstoffgehalt berechnet. Das zweite Präparat, aus Annamlack gewonnen, enthielt 7,2% H<sub>2</sub>O (bei

110° getrocknet), 4,6% Asche und 0,117% Mangan (colorimetrisch bestimmt); das dritte wurde aus *Medicago sativa* isolirt und hatte den enormen Aschegehalt von 45,2%.

Durch weitere Untersuchungen fanden Bertrand<sup>4)</sup> und Bourquelot,<sup>5)</sup> dass die Laccase in der Pflanzenwelt sehr verbreitet war, dabei konnte Bertrand ein zweites oxydirendes Ferment pflanzlichen Ursprungs isoliren, das wegen seiner Fähigkeit, Tyrosin zu oxydiren, Tyrosinase genannt wurde. Gairod<sup>6)</sup> entdeckte 1895 im Wein ein Ferment, dass das Sauerwerden desselben verursachte; Martinaud,<sup>10)</sup> Caze-neuve,<sup>7)</sup> Laborde<sup>8)</sup> und Lagatu<sup>9)</sup> konnten bei einer Wiederholung der Versuche die Richtigkeit der Gairod'schen Angaben bestätigen. 1897 isolirte Tolomei<sup>11)</sup> aus dem Olivenöl ein Ferment, welches das Sauerwerden des Oels verursacht, die Olease; Boutroux<sup>12)</sup> konnte aus dem Mehl ein oxydirendes Ferment darstellen, das Oxydin. So wurden also in den letzten Jahren 5 pflanzliche oxydirende Fermente isolirt, ohne hier von den Oxydasen thierischen Ursprungs zu reden, die von Abelous und Biarnès, Spitzer, Salkowski, Petry u. A. entdeckt und beschrieben wurden.

Da die Isolirung der oxydirenden Fermente viele Schwierigkeiten bietet, so ist ihre chemische Natur noch nicht Gegenstand eingehender Studien gewesen; Bertrand glaubte, sie seien organische Manganverbindungen, die sich leicht dissociiren, doch gründet sich seine Theorie mehr auf Analogien als auf experimentelle Prüfung. Es ist daher vor allen Dingen wünschenswerth, die pflanzlichen Oxydasen besser zu isoliren und sich mit den Gesetzen ihrer Wirkung und ihren Eigenschaften bekannt zu machen.

#### **Zur chemischen Natur der Oxydasen.**

Als Ausgangsmaterial zur Darstellung der Laccase dienten Kartoffeln und Kohl. Einige Kilo frischer gewaschener Kartoffeln wurden gehackt und zu Brei zerquetscht, dieser mit verdünnter Essigsäure (0,5—1 %) versetzt, um die Wirkung der Oxydase auf Tyrosin und andere Farbstoff liefernde Körper der Kartoffel zu vernichten. Nach 24 Stunden wurde das

Extract durch ein Tuch colirt und abfiltrirt. Das klare, röthliche oder gelbliche Filtrat wurde mit Ammonsulfat gesättigt, der so gewonnene Niederschlag, der Eiweisskörper, Farbstoffe und Ferment enthielt, auf einem Filter gesammelt, mehrmals mit kalter gesättigter Ammonsulfatlösung ausgewaschen und wieder in Wasser gelöst. Das Aussalzen mit Ammonsulfat und Auflösen in Wasser wurde 3 bis 4 Mal wiederholt. Die so gewonnene wässrige Lösung der Eiweissstoffe und Fermente der Kartoffeln wurde gegen fliessendes Wasser in einem Pergamentschlauch dialysirt und mit dem 4—5fachen Volumen 95%igen Aethylalkohols gefällt, der Niederschlag auf einem Filter gesammelt, mit Aether gewaschen und über Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet. Nach einigen Wochen wird der Niederschlag (ein gelblich-braunes Pulver) mit destillirtem Wasser extrahirt und man erhält eine wasserklare Lösung, aus der nach monatelangem Stehen (mit Chloroform gesättigt) ein feiner weisser Niederschlag ausfällt, doch ist die Menge desselben kaum zu wägen. Zur Darstellung des reinen Fermentes wird das beschriebene Extract mit dem 5—6fachen Volumen Aethylalkohol gefällt, der Niederschlag gesammelt und über Schwefelsäure im Exsiccator getrocknet. Die Ausbeute der reinen Laccase ist so klein, dass ich nach jahrelangem Sammeln ungefähr 1 g der reinen Substanz bekommen habe.

Die Darstellung der Laccase aus dem Kohl ist ganz dieselbe, die Ausbeute ist noch kleiner, aber das Präparat kann schneeweiss erhalten werden, während das aus den Kartoffeln dargestellte immer eine gelbliche Farbe hat.

Die Lösung dieser Präparate gab intensive Biuretreaction, Xanthoprotein-, Millon'sche, Liebermann'sche, Pettenkofer'sche und Adamkiewicz'sche Reaction, ebenso alle Alkaloid- und Fällungsreactionen.

Bei vollständiger Sättigung der Fermentlösung mit Magnesiumsulfat fällt die Laccase nicht ganz aus, Kochsalz und Natriumsulfat fällen sie garnicht, dagegen wird sie bei vollkommener Sättigung mit Ammonsulfat vollständig gefällt. Aethylalkohol fällt sie nur bei einem Gehalt von 90% aus.



Der Aschengehalt meiner Laccasepräparate ist sehr klein,  
die zwei ersten Präparate ergaben:

0,1218 Substanz lieferten 0,0014 Asche = 1,49%  
0,0861       "       "       0,0013       "       = 1,51%, im Mittel 1,5%.

Das dritte und vierte Präparat, die noch sorgfältiger  
dialysirt waren, ergaben:

0,1115 Substanz gaben 0,0011 Asche = 0,987%  
0,5415       "       "       0,0314       "       = 0,58%, im Mittel 0,78%.

Die Asche wurde in den über Schwefelsäure getrockneten  
Präparaten bestimmt, beim Trocknen bei 120° trat noch ein  
Wasserverlust von 2,75% ein. Die Asche enthielt Kalium,  
Natrium, Calcium und Spuren von Eisen, Phosphor und Mangan  
wurde in unseren Präparaten nicht gefunden.

In den Präparaten wurde ferner noch der Stickstoff- und  
Schwefelgehalt bestimmt, der Stickstoff nach Kjeldahl-  
Wilfarth:

Erstes Präparat	} aus Kartoffel	ergaben	12,82% N	} im Mittel 12,8% N
Zweites       "			12,86% N	
Drittes       "	} aus Kohl	12,74% N		
Viertes       "		12,76% N		

Der Schwefel wurde nach der Verbrennung mit Soda  
und Salpeter in Form von Baryumsulfat bestimmt:

Erstes Präparat	} aus Kartoffel	ergaben	0,60%	} im Mittel 0,53%
Zweites       "			0,56%	
Drittes       "	} aus Kohl	0,48%		
Viertes       "		0,50%		

Aus diesen Analysen ergibt sich, dass die Laccase aus  
Kartoffeln und Kohl eine eiweissartige Substanz  
(12,8% N, 0,53% S, alle Eiweissreactionen) und sehr  
arm an Asche ist. Sie gehört zu den Albuminen und  
enthält weder Mangan noch Phosphor.

#### Ueber einige Gesetze der Laccasewirkung.

Zur Bestimmung der Wirkung der Laccase wählte ich das  
Röhmann'sche Reagens, und zwar wurde die Menge des ent-  
standenen Farbstoffes colorimetrisch gemessen. Als Einheit diene  
folgende Lösung: 10 ccm. destillirtes Wasser, je 2 Tropfen 2%iger  
wässriger Paraphenylendiaminlösung und 2%iger wässe-

riger Metatoluilienlösung, 2 Tropfen ( $\frac{1}{10}$  ccm.) 10%iger Soda-  
lösung, dann wurde zur Mischung ein Tropfen 5%iger wässriger  
Ferrocyankalilösung beigelegt; die Menge des entstandenen  
Farbstoffs wurde gleich 100 gesetzt.

Die erste Reihe der Versuche wurde angestellt, um zu  
erfahren, ob es eine Proportionalität zwischen der Menge des  
Fermentes und der Menge des entstandenen Farbstoffes gäbe.  
In einer Reihe von Probirröhren wurden 10 ccm. der oben  
erwähnten Flüssigkeit abgemessen und mit verschiedenen  
Mengen der Ferment(Laccase)lösung versetzt. Nach einigen  
Stunden wurde der Farbstoffgehalt colorimetrisch bestimmt.

Nr. des Ver- suchs	Die Menge des Farbstoffs ohne Ferment	Mit 5 Tropfen Laccaselös.	Mit 10 Tropfen	Mit 15 Tropfen	Mit 20 Tropfen	Mit 25 Tropfen
1	4,0	5,0	6,25	8,75	10,5	—
2	5,0	7,25	17,0	22,0	26,0	30,0
3	6,0	7,0	10,0	15,0	19,0	20,0
4	5,0	7,25	13,0	14,5	17,0	19,0
5	8,0	16,5	21,7	30,0	36,0	42,0
6	5,0	6,0	9,25	17,0	20,0	24,0
7	8,0	20,2	27,0	36,0	38,0	39,0
8	5,0	7,75	12,0	16,0	18,5	18,5
9	5,0	7,0	11,0	15,0	16,0	16,5
10	5,0	6,25	7,5	8,0	11,0	16,0
Mittel	5,6	9,02	13,47	18,25	22,20	25,0

Setzt man die Menge des Fermentes gleich 1 und die  
Menge des durch die Fermenteinheit gebildeten Farbstoffs eben-  
falls gleich 1, so kann man die gewonnenen Resultate in  
folgender Tabelle darstellen:

Menge der Laccase . . . . .	1	2	3	4	5
Menge des entstandenen Farbstoffs . . .	1	1,49	2,09	2,34	2,62
Quadratwurzeln aus der Menge des Fer- mentes (nach Schütz-Borisoff). . .	1	1,41	1,90	2,00	2,23

Eine direkte Proportionalität besteht also nicht, dagegen  
entspricht die Menge des gebildeten Farbstoffs den

Quadratwurzeln aus der Menge des Fermentes. Von Medwedew<sup>14)</sup> wurde eine solche Proportionalität ebenfalls für die Leberoxydase constatirt; die pflanzlichen Oxydasen folgen also der Schütz-Borisoff'schen Regel, ebenso wie Pepsin, Pancreatin, Oleopsin u. s. w. (Walter)<sup>15)</sup>. In meinen Versuchen hat die Regel so lange Gültigkeit, bis die Menge des Fermentes auf das Vierfache vergrößert ist.

Zweitens wollte ich die Frage lösen, ob die Menge des Röhmann'schen Reagens die Menge des entstandenen Farbstoffs beeinflusst. Es wurden also zu 10 ccm. Fermentlösung verschiedene Mengen des Röhmann'schen Reagens gesetzt und nach einigen Stunden die Menge des entstandenen Farbstoffes colorimetrisch bestimmt.

	2 Tropfen	4 Tropfen	6 Tropfen	8 Tropfen	10 Tropfen	12 Tropfen	
Versuchs- Nr.	2 ‰ wässriger Lösung von Paraphenyl- und Metatoluidindiamin						
11	5,0	5,1	5,0	5,0	5,0	5,2	} zu einer Lösung der Laccase.
12	5,0	4,8	5,2	5,0	5,2	4,9	
13	5,0	5,	5,4	5,6	5,2	5,1	
14	5,0	4,8	5,2	5,1	5,4	5,2	
15	5,0	4,8	5,0	5,2	5,4	5,0	
Mittel	5,0	4,9	5,1	5,1	5,2	5,0	} zu einer Lösung von Ferr. sesquichlorat.
16 u. 17	3,5	5,5	6,0	7,5	7,5	10,0	
18 u. 19	5,0	6,5	8,0	11,0	15,0	20,0	
Mittel	4,3	6,0	7,0	9,3	11,3	15,0	

Die Menge des entstandenen Farbstoffs ist also eine Function der Menge des Fermentes, nicht aber der Menge des oxydirenden Reagens. Bei Anwendung eines anorganischen Sauerstoffüberträgers (wie Ferrum sesquichloratum) wird die Menge des entstandenen Farbstoffs proportional der Menge des oxydirenden Reagens.

In der Litteratur habe ich ein ganz analoges Factum gefunden: Duclaux<sup>19)</sup> theilt nämlich in seiner Mikrobiologie mit, dass die Menge der Dextrose, welche durch Invertinwirkung entsteht, eine Function der Menge des Invertins ist. Vielleicht liegt ja hier ein allgemeines Gesetz der Fermentwirkung vor.

Mit Hülfe der oben beschriebenen colorimetrischen Methode habe ich ferner die Versuche Bertrand's und Bouquelot's über die Wirkung der Reaction der Flüssigkeit auf die Farbstoffbildung (Oxydation) wiederholt. Wenn nun auch die Reaction einen grossen Einfluss ausübt und eine starke Säure die Thätigkeit des Fermentes vernichten kann, so kann man doch z. B. Kartoffellaccase 24 Stunden mit 0,8—1 %iger Essigsäure digeriren, ohne sie zu zerstören. Wenn man die Säure neutralisirt, fängt das Oxydationsvermögen der Laccase wieder an. Die folgende Tabelle zeigt die Stärke der oxydirenden Kraft des Fermentes nach Digeriren mit Säuren verschiedener Concentration.

Concentration Säuren	0,15 %	0,25 %	0,4 %	0,5 %	0,8 %	1,0 %	1,5 %	2,0 %
Salzsäure . . .	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	Sp	Sp	Sp	—
Essigsäure . . .	+	+	+	+	+	+	+	Sp
Ameisensäure .	+	+	+	+	+	+	Sp	Sp
Milchsäure . . .	+	+	+	+	+	+	+	+

Durch eine Reihe von Versuchen habe ich ferner festgestellt, dass die Laccase auch nicht durch Pepsinsalzsäure zerstört wird, wenn nur der Säuregehalt in der Flüssigkeit nicht 0,15—0,5 % übersteigt. Kurze Einwirkung der Pancreasverdauung zerstört sie ebenfalls nicht, wie schon Portier gefunden hat, lange fortgesetzte lässt die Kraft des Fermentes allmählich verschwinden.

Die tödtliche Temperatur für die Laccase variirt je nach der Reinheit des Präparates; die reinsten meiner Präparate

1) + Positiv, — Negativ, Sp Spuren.

wurden schon bei 50° zerstört, die aschereichsten erst bei 65—70°.

Aus dieser vorliegenden Arbeit lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Laccase gehört zu den Fermenten, denn:
  1. verliert sie ihre Wirkung bei hohen Temperaturen,
  2. ist ihre Wirkung proportional der Quadratwurzel ihrer Menge,
  3. ist die Menge des entstandenen Produktes eine Function der Menge des Fermentes, nicht aber der Menge der oxydirenden Substanz.
2. Zu den günstigsten Bedingungen der Oxydasewirkung gehört schwach alkalische Reaction, wie schon Bertrand und Bourquelot gefunden haben.
3. Die Laccase kann auf Grund ihres Stickstoff- und Schwefelgehaltes und ihrer Reactionen zu den Eiweisskörpern gerechnet werden. Ihr Aschegehalt kann sehr gering sein, ohne einen Einfluss auf die Oxydationswirkung zu haben.
4. Die Laccase wird weder durch schwache Säuren, noch durch peptische oder pancreatische Verdauung zerstört.

#### Litteratur.

- 1) Bertrand, C. R. de l'Ac. de Sc., 1894, S. 1215; ibidem 1895, S. 266 und S. 1166; ibidem 1896, S. 1132.
- 2) Hikorokuro Yoshida, Journ. of the chem. Society, 1883.
- 3) Bertrand, C. R. de l'Ac. d. Sc., 1896, S. 1215, S. 463.
- 4) Bertrand und Bourquelot, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1895, S. 738.
- 5) Bourquelot, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1896, S. 260 u. 423.
- 6) Bouffard, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1897 S. 706 u. 1063.
- 7) Cazeneuve, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1897 S. 406; ibidem S. 781.
- 8) Laborde, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1897, S. 248—536; ibidem 1896, S. 1074.
- 9) Lagatu, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1897, S. 512.
- 10) Martinaud, C. R. d. l'Ac. d. Sc., 1896, S. 502.
- 11) Tolomei, Olease, Atti Accad. dei Lincei, 1896.
- 12) Bouteux, Le pain.
- 13) Duclaux, Traité de microbiologie, T. III, 1900.
- 14) Medwedew, Pflüger's Archiv, Bd. LIV.
- 15) Walther, Petersburg, Inaug.-Diss., 1898 (russ).

# Ueber gerinnungshemmende Agentien im Organismus höherer Wirbelthiere.

Von

Dr. E. P. Pick in Wien

und

Dr. K. Spiro, Privatdocenten und erstem Assistenten des Instituts.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 41.)  
(Der Redaction zugegangen am 23. Oktober 1900.)

---

## I.

Seitdem Schmidt-Mühlheim<sup>1)</sup> und Fano<sup>2)</sup> vor etwa 20 Jahren in C. Ludwig's Laboratorium die Entdeckung von der Uncoagulirbarkeit des Blutes nach Injection von Produkten der Pepsinverdauung gemacht haben, hat sich das Interesse der zahlreichen Forscher, welche diese Erscheinung studirten, in erster Linie dem dabei im Organismus stattfindenden Vorgang als solchem zugewandt. Man hat die mit der Ungerinnbarkeit des Blutes einhergehenden morphologischen und chemischen Veränderungen am Blute selbst, die Veränderungen an der Lymphe (Lymphorrhöe) und Niere, die Senkung des Blutdrucks ebenso wie die Veränderung der Blutalkalescenz und endlich die dabei beobachtete eigenthümliche Immunität eingehend studirt. — Ueber die Natur des den ganzen Erscheinungscomplex auslösenden Agens sind bisher dagegen auffallend wenig Untersuchungen angestellt worden.

Während sich Schmidt-Mühlheim und Fano entweder die benutzten Peptone<sup>3)</sup> durch künstliche Verdauung selbst

---

1) Archiv f. Physiologie 1880. S. 50.

2) Ebenda 1881. S. 277.

3) Die meisten Autoren, welche sich mit vorliegendem Gegenstande beschäftigt haben, gebrauchen die Bezeichnung «Pepton» oder «Peptone» im Sinne Lehmann's und Brücke's für die Verdauungsprodukte schlechtweg ohne scharfe Unterscheidung der einzelnen Bestandtheile dieser Gemenge. Auch im Nachfolgenden ist dieser Sprachgebrauch vornehmst, wo es sich nicht um bestimmte Produkte handelt, beibehalten.

darstellten oder von källichen (Grübler'schen) Präparaten Gebrauch machten, benutzte W. Kühne in Gemeinschaft mit S. Pollitzer<sup>1)</sup> gereinigte Präparate, die nach seiner Methode dargestellt waren. Hierbei ergab sich, dass unter den Pepsin-Verdauungsprodukten zweien, der Protoalbumose (von der Heteroalbumose durch Dialyse getrennt) und dem Antipepton, ein Einfluss auf die Blutgerinnung nicht zukommt.

Auch A. Grosjean<sup>2)</sup> wandte bei seinen unter L. Fredericq's Leitung angestellten Untersuchungen «über die physiologische Wirkung von Propepton und Pepton» die Kühne'schen Darstellungsmethoden an. Die durch Pepsin-Chlorwasserstoffsäure (resp. Magenschleimhaut und Säure) aus Schweinsfibrin bereiteten Albumosen wurden mit Ammonsulfat gesättigt: Der Niederschlag, nach der Dialyse aus seiner Lösung mit Alkohol gefällt und gewaschen, stellte das «Propepton» dar, während die Mutterlauge, eingedampft, vom ausgeschiedenen Salz abgegossen, mit 2 Volumen Alkohol gefällt, durch Erwärmen vom Alkohol und durch Baryumcarbonat und Baryumhydrat vom Ammonsulfat befreit, das «Pepton» lieferte. Bei der intravenösen Injection ergab sich, dass die Behinderung der Coagulation nur durch das «Propepton», nicht durch das «Pepton» erzielt werden konnte, ein Resultat, das später mit der gleichen Methode von A. Ledoux<sup>3)</sup> bestätigt wurde. Zu erwähnen wäre ferner, dass auch nach den Untersuchungen von Ellinger und dem einen von uns<sup>4)</sup> dem nach verschiedenen Methoden dargestellten sog. «Antipepton» ein coagulationshemmender Einfluss nicht zukommt.

Bei allen diesen Untersuchungen kamen Verdauungsprodukte des Fibrins zur Anwendung. Erst Arthus und

---

1) Verhandlungen des Naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg N. F. Bd. 3, S. 292, 1885.

2) Travaux du laboratoire de L. Fredericq, T. IV., Liège 1892, S. 42.

3) Archive de biologie, Bd. 14., S. 63, 1896.

4) Spiro und Ellinger, Der Antagonismus gerinnungsbefördernder und gerinnungshemmender Stoffe im Blute und die sogenannte Peptonimmunität. Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 114, 1897.

Huber<sup>1)</sup> suchten zu zeigen, dass auch die Albumosen des Caseins (dargestellt durch Coagulation von Kuhmilch mittelst Lab und Auflösen des Coagulums in einem Glycerinextract von Hundepankreas) und die «Gelatosen» (aus einer starken Gelatinelösung mit künstlichem Pankreassaft gewonnen) ähnlich wie käufliches Fibrinpepton (Wittepepton) wirkten. Freilich waren von diesen Präparaten ausserordentlich hohe Dosen erforderlich; denn während von Wittepepton 0,3 g pro Kilo Thier mit Sicherheit bewirken, dass eine Blutprobe, die 2 $\frac{1}{2}$  Stunden nach der Injection entnommen wird, noch eine Stunde braucht, um fest zu werden, und dass die normale Gerinnbarkeit erst nach 3 $\frac{1}{2}$  Stunden bei dem Versuchsthier wiederkehrt, waren von den Albumosen des Caseins 1,5—1,75 g pro Kilo Thier und bei den Gelatosen gar 2 g nöthig, ohne jedoch stets eine volle Wirkung hervorzurufen. Diese Angaben wurden später auch von Chittenden, Mendel und Henderson<sup>2)</sup> bestätigt, die allerdings reine Gelatinpeptone ganz unwirksam fanden. Im Gegensatz zu diesen Resultaten, welche die nach «Pepton»-injection beobachteten Wirkungen ebenso wie deren grosse Toxicität mehr oder minder den meisten Albumosen zukommen lassen, führte eine Arbeit von E. Fiquet<sup>3)</sup> zu ganz abweichenden Ergebnissen. Derselbe zeigte im Laboratorium von A. Gautier, dass Albumosen, die nach dessen Verfahren gereinigt, d. h. einer combinirten Ammonsulfat-Alkohol-Behandlung unterworfen waren, absolut keine allgemein toxischen Wirkungen mehr zeigten, so dass z. B. ein Kaninchen die Injection von 10 g Pepton an einem Tage ohne Schaden ertrug. Auf die Bedeutung dieser Befunde für die Untersuchungen über die Nichtgerinnbarkeit des Peptonblutes hat M. Nencki<sup>4)</sup> ausdrücklich hingewiesen.

In jüngster Zeit endlich steuerten noch Chittenden und Mendel mit Mc. Dermott<sup>5)</sup> resp. Henderson umfang-

---

1) *Archive de physiologie*, Bd. 28, S. 857, 1896.

2) *Americ. Journal of Physiology*, Bd. 2, S. 157, 1899.

3) *Comp. rend. soc. de biol.*, Bd. 49, S. 459, 1897.

4) *Maly's Jahresbericht*, Bd. 27., S. 196, 1898.

5) *Americ. Journal of Physiology*, Bd. 1, S. 255, 1898.



reicheres Material für die vorliegende Frage bei, indem sie einmal verschiedene Eiweisskörper verdauen liessen, andererseits auch Papain als verdauendes Agens benutzten: Während die mit Pepsin und Trypsin aus coagulirtem Eialbumin erhaltenen Verdauungsprodukte im Ganzen wie die des Fibrins wirkten, zeigten Präparate von Hemipepton und «einer albumoseähnlichen Substanz», die ohne Zusatz von Fermentlösungen nur durch Einwirkung von Schwefelsäure gewonnen waren, eine auffallend geringe Wirkung. Auch ein aus reinem Edestin gewonnenes Antialbumid erwies sich als wenig, vielleicht gar nicht wirksam (normale Gerinnungszeit 3 Minuten, nach der Injection 4, resp. 9, resp. 4, resp. 5 Minuten).

Die durch Papain gewonnenen Produkte wirkten im Allgemeinen in kleineren Dosen und stärker als die durch animalische Verdauungsmittel erhaltenen.

W. H. Thompson<sup>1)</sup> endlich hat bei seiner umfangreichen und sorgfältigen Analyse der «Peptonwirkung» nur Grübler'sche Präparate verwandt.

Diese Uebersicht über die vorhandene Litteratur zeigt wohl, dass das bisher für die einschlägigen Studien gebrauchte «Pepton» etc. durchaus als nicht einwandsfreies Material zu bezeichnen ist. Zunächst ist das meist als Ausgangsmaterial verwandte Fibrin (und dasselbe gilt mehr oder weniger auch für die anderen nativen Eiweissstoffe) nicht nur ein Gemenge verschiedener Eiweisskörper, sondern auch ein Substrat, dem noch verschiedene andere Stoffe, zumal auch Fermente, anhaften. Ferner ist die zur Darstellung der Albumosen angewandte Methode der künstlichen Verdauung insofern nicht einwandsfrei, als dabei eine in ihrer Zusammensetzung und Wirkung unbekannte Verdauungslösung benutzt wird. Und dass endlich die zur Reinigung der Albumosen verwandten Methoden nicht ausreichend sind, braucht nach der eingehenden Arbeit des einen von uns (E. P. Pick)<sup>2)</sup> wohl nicht neuerdings dargelegt zu werden.

---

1) Journal of Physiology, Bd. 24, S. 378, 1899.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 246, 1897 und Bd. XXVIII, S. 219, 1899.

Wenn somit aus den bisherigen Untersuchungen nicht mit Sicherheit geschlossen werden kann, dass die beobachteten «Pepton»-wirkungen in der That den Albumosen oder doch bestimmten Spaltungsprodukten der Eiweisskörper zukommen, so verdienen jene Arbeiten um so mehr Beachtung, welche bei Anwendung eines völlig andersartigen Materials eine jener der Peptone analoge oder doch wenigstens ähnliche Wirkung sicherstellten. Hier ist neben dem seit Haycraft viel studirten Blutegelextract, dessen Eiweissnatur nach gelegentlichen eigenen, unveröffentlichten Untersuchungen zweifelhaft zu sein scheint,<sup>1)</sup> zunächst eine Beobachtung Fano's anzuführen. Die mit Hilfe von Trypsin dargestellten «Peptone» zeigen bekanntlich nicht die gleichen Wirkungen wie die durch Pepsin erhaltenen Produkte. Bedingung hierfür ist jedoch, wie schon Fano fand, dass die Trypsinverdauung unter Ausschluss von Fäulniss stattfindet; war die Fäulniss bei der Bereitung der Tryptone nicht vermieden, so verhalten sich die erhaltenen Produkte wie Pepsin-Peptone, sie hemmen die Blutgerinnung. Offenbar können also Bacterienprodukte wie Fibrin-albumosen wirken.

Noch wichtiger für die Beurtheilung der Albumosenwirkung sind Versuche, die Albertoni<sup>2)</sup> noch vor der Entdeckung Schmidt-Mülheim's über die Wirkung von Pepsin und Pankreatin auf das Blut angestellt hat, und aus denen hervorgeht, dass schon sehr geringe Mengen von den käuflichen Präparaten beider Fermente eine sehr starke anti-coagulirende Wirkung auszuüben im Stande sind.

Aehnliche Beobachtungen hat J. Salvioli<sup>3)</sup> an diastatischen Fermenten gemacht: Hundespeichel, Ptyalin, diastatisches Leberferment heben, in den Kreislauf von Hunden injicirt, die Gerinnbarkeit sofort auf und wirken auch im Uebrigen (z. B. auf die Alkalescentz des Blutes) wie Peptone,<sup>4)</sup> was auch in

---

<sup>1)</sup> Vgl. W. L. Dickinson, Journal of Physiology, Bd. 11, S. 566, 1890.

<sup>2)</sup> Centralblatt für die med. Wissensch. 1878 und 1879.

<sup>3)</sup> Centralblatt für die med. Wissensch. 1885, Nr. 51.

<sup>4)</sup> Salvioli, Veränderung des Blutes durch Peptone und lösliche Fermente, Maly's Jahresbericht Bd. 22, S. 89, 1892.

neuerer Zeit noch von Ch. Comtejean<sup>1)</sup> bestätigt und von H. Hildebrandt<sup>2)</sup> weiter ausgeführt worden ist.

Ebenso können vielleicht auf Fermente Beobachtungen zurückgeführt werden, wie sie Mosso<sup>3)</sup> am Murenidenserum, Delezenne<sup>4)</sup> am Aalserum, weiter Abelous und Billard<sup>5)</sup> an der Leber der Crustaceen und namentlich des Flusskrebse, und endlich C. J. Martin<sup>6)</sup> am Gift der australischen schwarzen Schlange (*Pseudechis porphyriacus*) gemacht hat. Namentlich die Beobachtungen am Schlangengift, wo 0,00001 g des Secretes pro Kilo Thier genügt (also ein Verhältniss 1 : 100 Millionen), um bei intravenöser Injection Hundeblut ungerinnbar zu machen, zeigen, wie minimaler Quantitäten es bedarf, um die Vorgänge der Blutgerinnung total zu ändern.

In diesen Fällen macht die ausserordentlich geringe Dosis, die zur Hervorrufung der Peptonwirkung genügt, eine chemische Untersuchung des wirksamen Principes unmöglich, daneben aber besitzen wir Erfahrungen, in denen den Eiweisskörpern nahe stehende, nicht durch Verdauung erhaltene Stoffe oder deren Spaltungsprodukte dieselbe Wirkung entfalten. Hier sind die Erfahrungen von C. A. Pekelharing<sup>7)</sup> zu nennen, der nach Einverleibung kleinerer Nucleoalbumindosen beobachtete, dass das Blut sich vollkommen wie Peptonblut verhielt. Hier wäre endlich noch die gerinnungshemmende Wirkung zu erwähnen, die nach den bekannten Untersuchungen Kossel's<sup>8)</sup> und Lilienfeld's<sup>9)</sup> dem in Zellkernen vorkommenden Nucleohiston, resp. dessen Spaltungsprodukten zukommt. Durch diese Untersuchungen ist das schon von Alexander Schmidt behauptete Vorkommen von gerinnungs-

---

1) Compt. rend. soc. biolog. Bd. 46, S. 833, 1895.

2) Virchow's Archiv, Bd. 121, S. 1, 1890.

3) Archiv f. exp. Path. u. Pharm., Bd. 25, S. 111, 1890.

4) Arch. de Physiol., Bd. 9, S. 646, 1897.

5) Compt. rend. soc. biol., Bd. 49, S. 991 und S. 1078, 1897.

6) Journal of Physiology, Bd. 15, S. 379, 1895.

7) Deutsch. med. Wochenschrift 1892, S. 1133.

8) Berl. klin. Wochenschr. 1893, Nr. 21.

9) Diese Zeitschr., Bd. 20, S. 103, 1895.

hemmenden Factoren in den Zellen («Cytoglobulin» und «Praeglobulin») zwar mit Sicherheit bewiesen, die von Lillienfeld gegebene Erklärung der Gerinnungshemmung und seine Ansicht über die Natur des wirksamen Agens hat aber theilweise lebhaften Widerspruch erfahren.<sup>1)</sup> Exacte Untersuchungen hat ferner in jüngster Zeit W. H. Thompson<sup>2)</sup> über die physiologische Wirkung der Protamine und ihrer Spaltungsprodukte ausgeführt, in denen gezeigt wurde, dass den Protaminen neben einer Art agglutinirender auch eine gerinnungshemmende Wirkung zukommt, und dass dieselbe schon nach einer zehnfach kleineren Dosis eintritt, als man bei den Albumosen zu reichen gewohnt ist. Durch Kochen mit verdünnter Säure, wobei die Protamine in die Protone A. Kossel's übergeführt werden, sah er die anticoagulirende Wirkung fast gänzlich verschwinden.

Von besonderer Wichtigkeit endlich sind mit Rücksicht darauf, dass als Ausgangsmaterial für die angewandten Albumosen Fibrin benutzt wird, die Untersuchungen von E. Gley<sup>3)</sup> über die anticoagulirende Wirkung von Kaninchenblut auf das Blut des Hundes. Aehnlich nämlich, wie nach den Untersuchungen Hayem's ein Hund, dem dreimal das eigene Blut entzogen und durch Pferdeblut ersetzt wird, ungerinnbares Blut liefert, wird ebenfalls bei dem Hund durch Kaninchenblut die Gerinnbarkeit noch mehr herabgesetzt. Werden 20 bis 30 ccm. Carotisblut vom Kaninchen möglichst schnell einem Hund von 5 bis 8 kg in die vena saphena injicirt, so bleibt das Blut des letzteren ca. 2 Stunden flüssig, nachdem es der Ader entnommen ist; das Serum des Kaninchens dagegen hat diese Wirkung nicht. Man darf danach vermuthen, dass die Substanz, welche die eigenthümliche anticoagulirende Wirkung bedingt, beim Fibrin oder den geformten Blutbestandtheilen zurückbleibt. An echten, genuinen Eiweissstoffen selbst hat man bisher eine anticoagulirende Wirkung noch nicht

---

1) Vgl. Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie. 4. Aufl. S. 164—167. 1899.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 1, 1899.

3) Compt rend. soc. biol. Bd. 48, S. 759. 1896.

beobachtet. Heidenhain<sup>1)</sup> führt zwar gelegentlich seiner Versuche über die lymphtreibende Wirkung der Albumosen auch ein Experiment an, in dem eine native Eiereiweisslösung lymphorrhöisch wirkte und eine ungerinnbare Lymphe lieferte, dem gegenüber hat jedoch der eine von uns<sup>2)</sup> schon zeigen können, dass bei Injection krystallisirten Serumalbumins diese Wirkung vermisst wurde, wie auch wahrscheinlich gemacht werden konnte, dass an der Wirkung der Albumosen ihre colloidale Beschaffenheit nicht betheiligt ist.

Aus all diesen in der Litteratur vorhandenen Angaben kann ein Schluss darauf, ob die genannten oder bestimmte Verdauungsprodukte als solche Träger der «Peptonwirkung» sind, oder aber ihnen anhaftende Beimengungen, nicht gezogen werden; immerhin muss bei der, wie man sieht, grossen Verbreitung anticoagulirend wirkender Stoffe und bei der ausserordentlich geringen Dosis, die bei einzelnen für eine volle Entfaltung ihrer Wirkung nöthig ist, die letztere Möglichkeit ernstlich ins Auge gefasst werden.

## II.

**Das Auftreten der gerinnungshemmenden Substanz bei Eiweisspaltung ist nicht an Darstellung durch Fermente gebunden.**

Da erfahrungsgemäss Eiweiss unter dem Einfluss von verschiedenen Fermenten, von Säuren und Alkalien dieselben oder doch sehr ähnliche Spaltungsprodukte liefert, wurde zunächst untersucht, ob ebenso wie bei Pepsinverdauung bei anderen Formen der Eiweisspaltung gerinnungshemmend wirkende Produkte auftreten. Als Ausgangsmaterial diente zunächst Fibrin.

### **Spaltung durch Fermente.**

#### *A. Pepsinverdauung.*

Dank der allgemeinen Zugänglichkeit dieser Methode sind auch bei weitaus den meisten Versuchen, die seit Schmidt-

---

<sup>1)</sup> Versuche und Fragen zur Lehre von der Lymphbildung, Pflüger's Archiv, Bd. 49. S. 209. 1891. Vgl. S. 240 und Protokoll XXI. S. 294.

<sup>2)</sup> Spiro, Ueber Diurese. Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 41. S. 148. 1898.

Mühlheim über Peptonwirkung angestellt worden sind, Präparate benutzt worden, welche mit Hilfe künstlicher Magenverdauung, sei es im Laboratorium, sei es fabrikmässig gewonnen waren. Leider ist diese Methode nicht ganz einwandsfrei; wie schon oben auseinandergesetzt, hat Albertoni gezeigt, dass dem Rohpepsin als solchem eine anticoagulirende Wirkung zukommt; wenn nun auch im Allgemeinen diese Fehlerquelle wegen der kleinen Quantitäten Pepsin, die zur Verdauung nöthig sind, nicht allzusehr in Betracht kommen wird, so ist doch damit ein wechselnder und unkontrollirbarer Factor eingeführt, der um so störender sein kann, als, wie ja bei dem Gift der schwarzen Schlange gezeigt, schon minimale Quantitäten eines wirksamen Stoffes eine ausserordentliche Wirkung ausüben können.

Um zu erfahren, ob die Anwesenheit von Pepsinpräparaten, bezw. von Pepsinferment überhaupt zur Bildung der gerinnungshemmenden Produkte nöthig ist, wurde der Versuch gemacht, sie bei Darstellung der Albumosen ganz zu umgehen.

#### Spaltung mit Säuren.

Ueber die Einwirkung von Säuren auf Eiweissstoffe besitzen wir genaue, quantitative Angaben mit möglichster Charakterisirung der entstandenen Produkte in der Dissertation unseres leider so früh verstorbenen Freundes Dr. Franz Goldschmidt.<sup>1)</sup> Derselbe wies nach, dass schon bei ganz schwachem Gehalt an Salzsäure, z. B.  $\frac{1}{10}$ -Normalsäure (ungefähr gleich der Concentration der Magensalzsäure) von vornherein bei Zimmertemperatur Albumosen in reichlicher Menge auftreten, und dass gerade diese Concentration es ist, welche für die Bildung löslicher, dem Zerfall zugänglicher Acidalbumine die günstigste ist. Es verlaufen bei dieser Concentration an Salzsäure die Spaltungen ganz ähnlich, wie bei der künstlichen Magenverdauung, nur dass der Magensaft der 0,2%igen Salzsäure insofern überlegen ist, als er den Spaltungsvorgang in hohem Maasse beschleunigt. Diesen Er-

---

<sup>1)</sup> Inaug.-Diss. Strassburg i. E. 1898. Dasselbst auch ein vollständiger Ueberblick über die frühere Litteratur.

fahrungen entsprechend haben auch wir bei unseren Spaltungen eine 0,2—0,4%ige Salzsäure angewandt und dabei reichlich Albumosen erhalten. Behufs Vermeidung von Pilz- und Schimmelpflanzung wurde mit Toluol versetzt.

Die Wirksamkeit der so erhaltenen Produkte zeigt das folgende Protokoll:

#### Versuch I.

2 kg frischen Fibrins wurden sorgfältig gewaschen und in 4 Liter 0,4%iger Salzsäure suspendirt durch 4 Tage der Bruttemperatur ausgesetzt. Nach dieser Zeit wurde das stark gequollene Fibrin von dem in Lösung gegangenen mittelst Colirens getrennt, die Lösung aufgeköcht, neutralisirt und der dabei löslich gebliebene Theil vom Coagulum und dem Acidalbumin abfiltrirt. Die filtrirte Lösung wurde auf dem Wasserbade eingedampft; der Trockenrückstand, der mit schwach saurer Reaction in Lösung ging, enthielt reichlich Albumosen aller Spaltungsphasen und Peptone. 5 g des Trockenrückstandes wurden in 55 ccm. Wasser gelöst, die Lösung mit  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  alkalisch gemacht und einem Hund im Gewicht von 9 kg 100 g in die vena femoralis injicirt.

Blutentnahme aus der a. femor.	Zeit der Gerinnung im Reagensglas	Zeit der Gerinnung in der Capillare <sup>1)</sup>
11 <sup>45</sup> Normalprobe	11 <sup>47</sup>	11 <sup>50</sup>
11 <sup>46</sup> —11 <sup>48</sup> Injection		
11 <sup>49</sup> tonisch-clonische Krämpfe aller Extremitäten, Trismus, tiefe Athmung;	} bleiben durch die zwei nächst- folgenden Tage flüssig.	
11 <sup>53</sup> tiefe Narkose.		
11 <sup>56</sup> Blutdruck unbeeinflusst.	2 <sup>00</sup>	2 <sup>15</sup>
12 <sup>03</sup>	2 <sup>00</sup>	2 <sup>30</sup>
12 <sup>08</sup> zeitweises Auftreten von Trismus u. Extremitätenkrämpfen.		
12 <sup>10</sup>	2 <sup>00</sup> geronnen vorgefunden	1 <sup>30</sup>
12 <sup>16</sup>	2 <sup>00</sup>	1 <sup>30</sup>
12 <sup>24</sup>	2 <sup>00</sup> geronnen vorgefunden	1 <sup>30</sup>
12 <sup>34</sup>	—	1 <sup>30</sup>

Um 2<sup>00</sup> liegt der Hund noch immer in tiefer Narkose; 2<sup>30</sup> Exitus.

Wie man sieht, zeigen die durch Säureeinwirkung aus Fibrin erhaltenen Produkte in Betreff der Wirkung aufs Blut dasselbe Verhalten im Organismus, wie die durch künstliche

1) Zur Bestimmung der Gerinnungszeit verfahren wir in der von Spiro und Ellinger angegebenen Weise. Diese Zeitschrift, Bd. 23, S. 119. 1897.

Magenverdauung gewonnenen. Zur Bildung der gerinnungshemmenden Substanz ist somit das Pepsin entbehrlich.

Es mag hier daran erinnert werden, dass auch die Protamine, deren albumoseähnliches Verhalten im Thierkörper W. H. Thompson im Kossel'schen Institut gezeigt hat, durch Säurespaltung aus den Spermatozoen dargestellt sind.

Da die Verhältnisse einer solchen künstlichen Säuredigestion — übrigens auch der üblichen künstlichen Verdauungsversuche — nicht in jeder Richtung mit jenen bei natürlicher Magenverdauung zusammenfallen, so war es von Interesse, festzustellen, ob auch in letzterem Fall die Bildung von toxischen bzw. gerinnungshemmenden Stoffen erfolgt.

#### Versuch II.

$\frac{1}{2}$  kg Pferdefleisch wurde gut zerhackt, zweimal durch  $\frac{1}{2}$  Stunde behufs Entfernung irgend welcher etwa vorhandenen Eiweisspaltungsprodukte ausgekocht und einem Hunde, der 24 Stunden vorher zuletzt gefüttert wurde, gereicht. Auf der Höhe der Verdauung (nach 4 Stunden) wurde der Hund getödtet, der Magen abgeschnürt und der Mageninhalt herausgehoben. Derselbe wurde in Wasser suspendirt und zur Entfernung der coagulablen Eiweisskörper bei der nativ schwach sauren Reaction aufgekocht und das neutralisirte Filtrat zur Trockne eingedampft. Die gebildeten Verdauungsprodukte waren mit Ammonsulfat theils leicht ausfällbar ( $\frac{1}{2}$ -Sättigung erzeugte massenhafte Fällung,  $\frac{2}{3}$ - und Ganzsättigung der neutralen und sauren Lösung Trübungen), theils bestanden sie aus Peptonen, die erst durch Zusatz von Jodquecksilberkalium mit HCl abzuscheiden waren und schöne Biuretprobe lieferten. Von diesen Produkten wurden 4 g in alkalischer, 15 ccm. fassender Lösung einem 8 kg schweren Hund intravenös beigebracht.

Blutentnahme aus der a. femoralis	Zeitpunkt der Gerinnung im Reagensglas	Zeitpunkt der Gerinnung in der Capillare
9 <sup>41</sup> Normalprobe	9 <sup>44</sup>	9 <sup>44</sup>
9 <sup>44</sup> —9 <sup>45</sup> Injection der Lösung		
9 <sup>47</sup> Eintritt von narkot. Wirkg.	} Alle Proben wurden erst den nächsten Morgen geronnen vorgefunden.	
9 <sup>56</sup> Blutdrucksenkung; Abgang von Fäces.		
10 <sup>03</sup>		
10 <sup>09</sup>		

Das Thier bleibt am Leben.

Aus diesem Versuch geht also hervor, dass auch innerhalb des Organismus Verdauungsgemenge, welche die typische Wirkung haben, gebildet werden, dass somit nicht irgend



welche ausseren Bedingungen der künstlichen Pepsinverdauung, z. B. ein anderes quantitatives Verhältniss von Ferment und Salzsäure, an der Bildung der toxischen Produkte Schuld trägt.

### *B. Trypsinverdauung.*

Den oben angeführten Versuchen von Fano und anderen gegenüber, wonach die Trypsinpeptone der Blutwirkung entbehren, bleibt der Einwand bestehen, dass in Folge der bekanntlich ausserordentlich rapid verlaufenden Pankreasverdauung andere und zwar einfacher gebaute Produkte zur Untersuchung kamen, als bei der so viel langsamer verlaufenden Pepsinverdauung. Aus diesem Grunde haben wir noch mit einer nur ganz kurz dauernden Trypsinverdauung einen Versuch angestellt, wo im verwandten Präparat durch Halbsättigung<sup>1)</sup> mit Ammonsulfat fällbare Albumosen reichlich vorhanden waren.

#### Versuch III.

4 g dieses Präparates in 12 ccm. Wasser wurden einem 5200 g schweren Hund in die Vene eingebracht. Die Gerinnungszeit des Blutes änderte sich nicht. Trotzdem erwies sich das Thier bei einer eine halbe Stunde später vorgenommenen Injection von früher sehr wirksam gefundenem « Säurepepton » als immun.

Dass die Immunität aber nur eine durch die Pankreasalbumosen bedingte war, ergab sich aus einem fünf Tage später ausgeführten Kontrollversuch, wo Wittepepton am selben Thier seine gewöhnliche Wirkung entfaltete.

Die somit neuerdings nachgewiesene Unwirksamkeit der Pankreasprodukte konnte in einer besonderen Art der entstehenden Albumosen ihren Grund haben oder aber darin, dass die Trypsinverdauung bei neutraler oder schwach alkalischer Reaction (so waren unsere Präparate hergestellt) vorgenommen wird. Ob bei Pankreasverdauung in schwach saurer Lösung, z. B. bei Ueberschuss von Salicylsäure, etwa doch noch wirksame Gemenge entstehen, haben wir nicht geprüft.

---

<sup>1)</sup> Ueber die Bildung von Albumosen bei der Pankreasverdauung vgl. Kurajeff, Zeitschrift f. physiol. Chemie. Bd. XXVI, S. 504. 1898. Ueber eingehendere, im hiesigen Institut angestellte, diesbezügliche Untersuchungen wird demnächst Herr Dr. F. Baum berichten.

### *C. Autolyse.*

Durch die Untersuchungen von E. Salkowski<sup>1)</sup> und A. Dastre<sup>2)</sup> wissen wir, dass feuchtes Fibrin in Salzlösungen oder Chloroformwasser aseptisch aufbewahrt sich langsam auflöst, dabei Albumosen und Peptone und dann endlich auch Aminosäuren bildend. Es liegt am nächsten, darin die Wirkung eines dem Fibrin anhaftenden Fermentes zu sehen, das eine autolytische Wirkung in ähnlicher Weise entfalten kann, wie dies die von Salkowski in anderen Organen nachgewiesenen und von M. Jacoby besonders an der Leber studierten autolytischen (früher Autodigestions-) Fermente zeigen.

Wir benutzten zu unseren Versuchen Fibrin, das längere Zeit in Alkohol gelegen hatte, nachdem es vorher wiederholt und gründlich in der bekannten Weise ausgewaschen war. Trotzdem löste sich dasselbe beim Aufbewahren im Brutschrank bei einer Temperatur von 40° in einer 1%igen Kochsalzlösung unter Toluol ziemlich schnell bei neutraler Reaction. Von dem wenigen Ungelösten wurde abfiltrirt und die Lösung bei ganz schwach saurer Reaction coagulirt, das die entstandenen Albumosen und Peptone enthaltende Filtrat (A) eingedampft und in der üblichen Weise weiter verarbeitet.

Das erhaltene Produkt stellte einen stark hygroskopischen Syrup dar, der neben einer schönen Biuret-, Millon'schen Reaction eine nur schwache Schwefelbleiprobe lieferte. Die Kohlenhydratreaction nach Molisch war positiv. Von Albumosen liessen sich alle Spaltungsstufen nachweisen, die leicht mit Ammonsulfat aussalzbaren Produkte waren in geringerer Menge vorhanden, reichlicher die bei  $\frac{1}{2}$ - und Ganzsättigung der neutralen Lösung ausfallenden Albumosen. Auf Zusatz von Säure zur salzgesättigten neutralen Lösung erhielt man nur Opalescenz. Im albumosenfreien Filtrate waren durch Biuretreaction und durch Fällung mit Jodquecksilberkalium mit Salzsäure nachweisbare Peptone vorhanden.

Das durch Kochen erhaltene Gerinnsel wurde mit 0,4%iger Salzsäure bei Bruttemperatur digerirt, die Lösung wie in den früher angeführten Säureversuchen weiter behandelt (B).

---

1) Zeitschr. f. Biologie, Bd. 7, S. 92, 1889.

2) Compt. rend., Bd. 118, S. 959, 1894.

#### Versuch IV.

Injection von 5,5 g der spontan in Lösung gegangenen Produkte (A) an einem 9 kg schweren Hund ergab keine Verlängerung der Gerinnungszeit, keine Fibrinolyse, auch keine Wirkung auf das Centralnervensystem und den Blutdruck.

Eine 40 Minuten später zur Kontrolle vorgenommene Injection von Wittepepton zeigte die typische Wirkung: unter Blutdrucksenkung Ungerinnbarkeit des Blutes.

#### Versuch V.

5,5 g wurden einem 10 kg schweren Hund beigebracht. Das Ergebniss war ebenso negativ wie in Versuch IV.

Es erhebt sich nunmehr, da die bei der Autolyse aus dem Fibrin entstehenden Albumosen sich als unwirksam erwiesen haben, die Frage: ist die wirksame Substanz — ohne über deren Natur etwas aussagen zu wollen, ob Albumose oder nicht — gar nicht entstanden oder bei der Autolyse zerstört worden?

Eine Entscheidung dieser Frage war vielleicht zu erhalten durch Untersuchung der Säureeinwirkungsprodukte von A und B. Wir haben beide daher in der oben angegebenen Weise der Säureeinwirkung unterworfen und die dabei entstehenden Albumosen einem Hund intravenös injicirt.

#### Versuch VI.

Einem 15 kg schweren Hund wurden 10,5 g der durch Säurewirkung aus dem Gemenge A erhaltenen Produkte, welche immerhin noch geringe Mengen durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbarer Albumosen enthielten, intravenös beigebracht. Das Ergebniss war völlig negativ. Ein nachträglich mit Wittepepton ausgeführter Kontrollversuch ergab die völlige Empfänglichkeit des Thieres für Peptonwirkung.

#### Versuch VII.

Ein 14,5 kg schwerer Hund erhielt 8 g der durch Säure aus dem Coagulum B erhaltenen Produkte, welche reichlich die verschiedenen Formen der Albumosen und echten Peptone enthielten, intravenös.

Injection 11 Uhr 26 Min. bis 11 Uhr 28 Min. Nach zwei Minuten tritt tiefe Narkose ein, der Blutdruck ändert sich nicht (!). Die um 11 Uhr 30 Min., 11 Uhr 36 Min., 11 Uhr 43 Min., 11 Uhr 51 Min. entnommenen Blutproben bleiben 24 Stunden lang ungeronnen. Der Hund wird den andern Tag morgens todt im Käfig vorgefunden.

Aus diesem und dem vorhergehenden Versuche ergibt sich daher das Folgende: Die bei der Autolyse des Fibrins entstehenden Produkte haben weder als solche, noch nach der Säurespaltung eine anticoagulirende Wirkung, andererseits jedoch wird durch den Vorgang der Autolyse die Muttersubstanz des anticoagulirenden Agens nicht zerstört; denn wenn man den Process der Autolyse zu einer Zeit unterbricht, wo noch nicht alle in Lösung gegangenen Eiweisskörper in Albumosen oder weiterstehende Produkte gespalten sind, so liefert der coagulable Antheil bei Säureeinwirkung gerinnungshemmende Produkte. Dabei bleibt allerdings unentschieden, ob die coagulablen Eiweisskörper als solche, oder eine ihnen beigemengte andere Substanz das gerinnungshemmende Agens liefert.

#### Spaltung durch Säure und Alkali.

Dass Säure auch ohne Mitwirkung von Pepsin aus Rohfibrin und aus den vom Fibrin bei der Autolyse erhältlichen coagulablen Produkten das gerinnungshemmende Agens bildet, ist aus den oben angeführten Versuchen ersichtlich.

Es konnte danach erwartet werden, dass auch die Alkalispaltung zum gleichen Resultat führen würde. Die Vermuthung bestätigte sich aber nicht.

#### Versuch VIII.

Fibrin wurde mit 0,3%iger Sodalösung eine Woche hindurch bei 40° C. digerirt und hierauf aus der Digestionsflüssigkeit in üblicher Weise Albuminsäure und «Alkalialbumose»<sup>1)</sup> ausgefällt.

In dem Gemenge der in Lösung gegangenen Spaltungsprodukte ergab die Prüfung mit gesättigter Ammonsulfatlösung, dass insbesondere die bei  $\frac{1}{2}$ - und  $\frac{2}{3}$ - Sättigung ausfällbaren Albumosen in reichlicher Menge vorhanden waren. Volle Sättigung der neutralen und schwach sauren Lösung erzielte in den angestellten Proben nur eine Opalescenz. Im albumosenfreien Filtrate trat noch deutliche Biuretreaction auf, nach Zusatz von Gerbsäure Fällung, während Jodjodkalium und Jodquecksilberkalium mit HCl keine oder nur unbedeutende Reaction aufwiesen.

---

<sup>1)</sup> Vgl. Otto Maas, Ueber die ersten Spaltungsprodukte des Eiweisses bei Einwirkung von Alkali. Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 61, 1900.

schwach alkalischen Wassers intravenös injiziert. Es wurde nur eine vorübergehende narkotische Wirkung, keine Aenderung des Blutdrucks und namentlich auch der Blutgerinnbarkeit beobachtet.

Dass das Thier nicht von vornherein gegen Pepton immun war, ergab die eine halbe Stunde später vorgenommene Injection von Wittepepton, welche in jeder Richtung typisch wirkte.

Aus den angeführten und zahlreichen anderen im gleichen Sinne verlaufenen Versuchen lässt sich entnehmen, dass das Auftreten der gerinnungshemmenden Substanz nicht an die Spaltung durch ein Ferment geknüpft ist, da das Trypsin und das proteolytische Ferment der Autolyse in dieser Richtung unwirksam, Pepsin zum Mindesten entbehrlich ist.

Hiermit soll der Frage, ob nicht andere Fermente bei Abwesenheit von Säure aus Fibrin und anderen Eiweissgemengen ein gerinnungshemmendes Agens erzeugen, nicht vorgegriffen sein. Die oben angeführten Versuche von Chittenden, Mendel und Henderson über die Wirksamkeit der Papainverdauung lassen sich wohl in diesem Sinne deuten, ebenso die Beobachtung von Albertoni, dass aus dem Fermentgemenge des Pankreas an und für sich schon bei der intravenösen Injection gerinnungshemmende Stoffe erhalten werden können; auch die Erfahrungen Fano's, dass Tryptone, bei deren Bereitung Fäulniss nicht ausgeschlossen war, wirksam waren, können hier herangezogen werden.

Wir haben bis jetzt die Sache nach dieser Richtung nicht weiter verfolgt, ebenso wenig wie die naheliegende Frage, ob Alkali, Trypsin und autolytische Fermente etwa den durch Säure gebildeten gerinnungshemmenden Körper zerstören.

Für die uns wesentlich beschäftigende Frage, ob das gerinnungshemmende Agens eine Albumose ist, ergibt sich aus dem Vorgeführten zunächst:

Albumosengemenge aus Rohfibrin, wenn sie durch Einwirkung von Trypsin, Autolyse oder Alkali erhalten sind, besitzen keine Wirkung auf die Blutgerinnung, obgleich sie nachweisbar Albumosen enthalten, die sich von den durch Pepsinsalzsäure oder Säure allein erhältlichen zur Zeit nicht unterscheiden lassen.

### III.

**Aus reinen Eiweisskörpern (Edestin, Casein) lässt sich keine gerinnungshemmende Substanz gewinnen.**

Nachdem wir in der Einwirkung verdünnter Säuren ein Mittel kennen gelernt hatten, welches ermöglichte, unter Vermeidung von Fermentpräparaten zu wirksamen Spaltungsprodukten zu gelangen, lag es nahe, die Versuchsanordnung noch weiter zu vereinfachen und die Säure auf reine, von den an nativen Eiweissgemengen stets anhaftenden Beimengungen freie Eiweisskörper einwirken zu lassen. Hier konnte mit aller Klarheit entschieden werden, ob die gerinnungshemmende Substanz regelmässig ein Spaltungsprodukt der Eiweissstoffe darstellt, wie das zu erwarten, wenn sie mit einer der durch Säure entstehenden Albumosen zusammenfiel.

Als leicht zugängliche Eiweisskörper, die auch in genügender Reinheit zu beschaffen waren, erwiesen sich Casein und Edestin,<sup>1)</sup> jenes thierischen, dieses pflanzlichen Ursprungs. Bei beiden ging die Albumosenbildung in verdünnter Säure nur recht langsam vor sich, zumal das Casein in verdünnten Säuren gar nicht, das Edestin nicht sehr löslich ist. Die entstandenen Albumosen, deren Reinigung und Charakterisirung nicht im Rahmen dieser Arbeit lag, waren schön aussehende weisse Körper.

#### Versuch IX.

200 g nach Hammarsten's Angaben dargestelltes, von Höchst bezogenes Präparat wurden mit 1 Liter 0,4%iger Salzsäure durch 4 Tage bei Bruttemperatur digerirt, der dabei entstandene, stellenweise von eingetretener Liebermann'scher Reaction violett verfärbte dickliche Brei in ca. 2 Liter Wasser aufgeschwemmt, bis zur schwach sauren Reaction abgestumpft und behufs Coagulation des ungespaltenen Restes durch 1½ Stunden auf dem Wasserbade gekocht. Die von dem bei der Neutralisirung sich abscheidenden Acidalbumin und vom ausgefallenen Coagulum abfiltrirte Flüssigkeit wurde bei neutraler Reaction auf dem Wasserbade zur Trockne eingedampft. Die Gesamtmenge der so er-

---

<sup>1)</sup> Die negativen Resultate, die Chittenden, Mendel und Henderson in einem Falle mit dem Edestin schon erhalten haben ohne es weiter zu verfolgen, sind schon oben angeführt worden (S. 238).

verascht hinterliess einen nur geringen anorganischen Rückstand. Das Präparat löste sich leicht in  $H_2O$ , die Lösung reagierte sauer und zeigte mit Ammonsulfat geprüft die Anwesenheit sämtlicher Albumosen-fractionen, besonders reichlich der durch Halbsättigung und der durch Ganzsättigung erhältlichen Antheile.<sup>1)</sup>

15 g der Substanz wurden in ca. 50 ccm. Wasser gelöst, mit Soda schwach alkalisch gemacht und einem 7,5 kg schweren Hunde intravenös einverleibt.

Blutentnahme aus der a. femoralis	Zeitpunkt der Gerinnung Eprouvette Capillare	
11 <sup>00</sup>	11 <sup>16</sup>	11 <sup>14</sup> bleibt geronnen
Normalprobe		
11 <sup>12</sup> -11 <sup>16</sup> intravenöse		
Injection in die v. femor.		
11 <sup>18</sup> schwache Narkose, starke	11 <sup>30</sup>	11 <sup>30</sup> sofort nach der Gerinnung
Blutdrucksenkung		tritt Fibrinolyse ein <sup>2)</sup>
11 <sup>34</sup>	11 <sup>41</sup>	11 <sup>42</sup> später eintretende, schwächere
		Fibrinolyse als vorher
11 <sup>30</sup>	11 <sup>44</sup>	11 <sup>44</sup> der gleiche Befund
11 <sup>30</sup>	11 <sup>51</sup>	11 <sup>47</sup> „ „ „
11 <sup>44</sup>	11 <sup>56</sup>	11 <sup>51</sup> „ „ „

Alle Fibrinolyse aufweisenden Proben bleiben tagelang gelöst.  
Hund am nächsten Morgen todt im Käfig aufgefunden.

#### Versuch X.

##### Säurespaltung des Edestins.

100 g krystallisirten Edestins wurden eine Woche hindurch bei Bruttemperatur mit 0,8%iger Salzsäure stehen gelassen und nach Ablauf dieser Zeit die Spaltungsprodukte in der von uns geübten Weise isolirt. Die Spaltung ging relativ langsam vor sich, und auch die Menge der erhaltenen Produkte war gering. Der grösste Theil des zur Spaltung angewandten Materials fiel als Acidalbumin aus oder blieb bei der nachfolgenden Coagulation zurück. Die nach dem Einengen auf dem Wasserbade erhaltenen Produkte stellten eine schön weiss gefärbte Masse dar. Die gesammte Ausbeute betrug ungefähr 10 g. Das Präparat löste sich mit schwach saurer Reaction leicht in Wasser, in concentrirter Lösung hinterliess es eine Trübung, die auch auf Zusatz von schwachem Alkali nicht völlig schwand. Die Lösung gab eine schöne Biuret- und Millon'sche

<sup>1)</sup> Vgl. F. Alexander, Diese Zeitschr., Bd. XXV, S. 411.

<sup>2)</sup> Dass das Caseinpräparat noch ein proteolytisches Ferment enthielt, konnte in besonderen Versuchen durch Autolyse in Kochsalzlösung gezeigt werden.

Reaction, liess sich fällen durch 95%igen Alkohol, verdünntes Kupfersulfat, sowie Essigsäure mit Ferrocyankalium. Die Reaction nach Molisch, sowie die Schwefelbleireaction blieben negativ. Gesättigte Ammonsulfatlösung erzeugte:

bei $\frac{1}{2}$ -Sättigung:	$\frac{1}{2}$ -Sättigung:	voller Sättigung der neutr. Lösung:	voller Sättigung der saur. Lösung:
massenhafte flockige Fällung	Opalescenz	Flocken	Trübung

Das albumosenfreie Filtrat zeigte Biuretreaction und gab mit Jodjodkalium, sowie mit Jodquecksilberjodkalium und Salzsäure Fällung. Es waren demnach bei der Säuredigestion sowohl verschiedene Albumosen wie auch Peptone entstanden.

Ein Hund von 3,2 kg erhält intravenös 4 g, gelöst in 12 ccm. mit Soda schwach alkalisch gemachten Wassers.

Es tritt weder Gerinnungsverzögerung noch Fibrinolyse auf. Auch andere Wirkungen der «Peptone» fehlen.

Nach 6 Tagen erhielt das Thier behufs Prüfung auf etwaige «Peptonimmunität» Wittepepton injicirt, worauf es in typischer Weise reagirte.

Aus den angeführten Versuchen geht übereinstimmend hervor, dass das aus reinem Material nach einwandsfreier Methode dargestellte Albumosengemenge, obgleich im Wesentlichen nur die bisher als besonders wirksam angesehenen, durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Spaltungsprodukte injicirt wurden, einen Einfluss auf die Blutgerinnung nicht zeigt.

#### IV.

Die durch Säure gebildeten Spaltungsprodukte verlieren ihre gerinnungshemmende Wirkung bei entsprechender Reinigung.

Wie oben hervorgehoben, wirken nach Kühne und Pollitzer alle durch Pepsinverdauung des Fibrins erhältlichen Produkte mit Ausnahme der Protalbumose und des Antipeptons gerinnungshemmend, nach Grosjean und Ledoux das durch Sättigung mit Ammonsulfat fällbare «Propepton», nicht aber das der Fällung dabei entgehende «Pepton».

Nachdem es dem einen von uns (Pick) gelungen war, durch Salzfractionirung und anschliessende Alkoholbehandlung die einzelnen Verdauungsprodukte schärfer als bisher zu trennen und zu charakterisiren, lag es nahe, die Wirksamkeit der gereinigten Produkte zu untersuchen.



Ammonsulfat allein zur Abtrennung gerinnungshemmender Fractionen führt.

#### Versuch XI.

##### a) Durch Ammonsulfathalbsättigung fällbare Fraction.

Dieselbe ist im Wesentlichen ein Gemenge von Proto- und Heteroalbumose. Sie wurde derart dargestellt, dass Wittepeptonlösung mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt und der gut abgepresste Niederschlag in Wasser gelöst zur Entfernung des Salzes der Dialyse unterworfen wurde. Die nach 5 tägiger Dialyse theilweise ausgefallene Heteroalbumose löste sich nach Zufügen von Kochsalz. Die Lösung war 3%ig.

Einem 10,7 kg schweren Hunde werden 2 Mal 50 ccm. dieser Lösung injicirt.

Die nach der ersten Injection entnommenen Blutproben blieben Stunden lang ungeronnen. Die zweite, 20 Minuten später ausgeführte Injection war ohne deutlichen Erfolg.

#### Versuch XII.

##### b) Filtrat der nach Zweidrittel-Ammonsulfatsättigung abgeschiedenen Produkte.

Diese Fraction enthielt mit Ausnahme der sogenannten «primären» Albumosen und der Albumosenfraction A alle übrigen im Wittepepton vorhandenen Produkte, also die schwerer aussalzbare Fraction B, die Albumose C, die Peptone und die nicht mehr Biuretreaction gebenden, im Wittepepton enthaltenen Körper. Die Darstellung des Präparates erfolgte derart, dass die mit doppeltem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällte Wittepeptonlösung von dem entstandenen Niederschlage filtrirt und durch 4 Tage dialysirt wurde. Hierauf konnte der nach dem Eindampfen der dialysirten Flüssigkeit erhaltene Trockenrückstand in schwach alkalischer Lösung zur Injection verwendet werden.

Einem 7 kg schweren Hund wurden 3,5 g des Trockenrückstandes injicirt. Die nach der Beibringung entnommenen Blutproben waren noch am anderen Tag ungeronnen.

#### Versuch XIII.

##### c) Filtrat nach Ausfällung der Albumosen durch Sättigung der neutralen Lösung mit Ammonsulfat.

Die Darstellung der hier verwendeten Produkte erfolgte derart, dass von dem bei voller Sättigung der Wittepeptonlösung mittelst Eintragung von gepulvertem Ammonsulfat abgeschiedenen Albumosenkuchen abgegossen wurde und in der stark salzhaltigen Lösung die Hauptmenge des Ammonsulfats durch vorsichtiges Fällern mit Alkohol entfernt wurde. Die hierauf eingeengte, noch immer etwas salzhaltige Lösung enthielt

nur die Albumose C, die Peptone und die nicht mehr Biuret gebenden Körper. Von diesen Produkten wurden 4 g in 4 ccm. bei schwach alkalischer Reaction gelöst und einer 8 kg schweren Hündin intravenös eingespritzt.

Die nach der Injection entnommenen Blutproben waren noch am anderen Tage ungeronnen.

Aus diesen Versuchen scheint im Gegensatz zu den älteren Angaben hervorzugehen, dass die Gerinnungshemmung nicht auf bestimmte Salzfractionen beschränkt ist.

Wir verzichteten daher auf die Weiterführung dieser Trennungsversuche und wandten uns der Combination der Salz-fällung und Alkoholbehandlung zu, die dem einen von uns bei der Trennung der Proto- und Heteroalbumose besondere Dienste geleistet hatte.<sup>1)</sup>

#### Versuch XIV. und XV.

##### Wirkung der Protoalbumose und Heteroalbumose.

Die Darstellung erfolgte in der von dem einen von uns beschriebenen Weise. Die Trennung der Protoalbumose von der Heteroalbumose wurde durch fünfstündiges Erhitzen des Gemenges beider Albumosen mit dem gleichen Volumen 95 %igen Alkohols erzielt.

##### Protoalbumose.

2 g der trockenen Protoalbumose wurden in 50 ccm. 0,9 %iger Kochsalzlösung gelöst und einem 6,5 kg schweren Hunde intravenös beigebracht. Es tritt Blutdrucksteigerung ein! Das Blut zeigt keine Veränderung seiner Gerinnbarkeit, auch keine Fibrinolyse.

Eine  $\frac{1}{2}$  Stunde später vorgenommene Injection von Wittepepton ergibt Blutdrucksenkung auf die Hälfte der normalen Höhe, aber keine Ungerinnbarkeit des Blutes.

#### Versuch XVI.

##### Heteroalbumose.

Auch in diesem Fall war die Trennung der beiden durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbaren Albumosen mit kochendem Alkohol erzielt worden.

Ein 5 kg schwerer Hund erhielt 1,8 g der aschefreien, in verdünnter Sodalösung gelösten Substanz intravenös.

Der Blutdruck steigt um 40 mm an, Gerinnungsverzögerung trat nicht ein, ebensowenig Fibrinolyse.

---

<sup>1)</sup> Vgl. E. P. Pick, Zur Kenntniss der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 219, 1898.

Nachträgliche Injection von Wittepepton erzielt sehr starke Blutdrucksenkung, aber keine Gerinnungsverzögerung.

#### Versuch XVII.

##### **Heteroalbumose.**

Bei der Darstellung dieses sehr reinen Präparats hatte die zur Abtrennung der Protalbumose angewandte Behandlung mit Alkohol in der Kälte stattgefunden.

Einer 6,3 kg schweren Hündin wurden 3 g in 30 ccm. Sodalösung in die vena femoralis injicirt.

Der Blutdruck sinkt vorübergehend stark, erreicht aber bald die ursprüngliche Höhe. Eine Verzögerung der Gerinnung tritt nicht ein.

Nachträgliche Injection von Wittepepton ist ohne Wirkung.

Aus den mitgetheilten Versuchen ergibt sich der auffällige Widerspruch, dass reine Proto- und Heteroalbumose auf die Blutgerinnung ohne Wirkung sind, während sich das Gemenge der beiden, wie es in dem durch Halbsättigung mit Ammonsulfat erhältlichen Niederschlag vorliegt, sich als kräftig wirksam erwiesen hatte. Dadurch wird die Vermuthung wachgerufen, dass die bei der Reindarstellung der Proto- und Heteroalbumose benutzte Alkoholbehandlung das Verschwinden der Gerinnungswirkung bedingt.

Dies konnte in der That nachgewiesen werden: Es genügt eine mehr oder weniger intensive Behandlung des sonst so wirksamen Wittepeptons, also des gesammten Albumosengemenges mit Alkohol, um ihm die gerinnungswidrige Wirkung ganz oder doch zum grössten Theil zu nehmen.

#### Versuch XVIII.

##### **Wirkung des Alkoholniederschlags aus Wittepepton.**

Die Lösung von 200 g Wittepepton in 1500 ccm. H<sub>2</sub>O wurde in einem grossen Kolben 5 Stunden lang unter Rückfluss mit dem gleichen Volumen 95%igen Alkohols gekocht. Nach dem Abkühlen wird der entstandene Niederschlag von der alkoholischen Lösung getrennt und beide für sich behandelt.

##### **Wirkung des Niederschlags.**

Der gut abgepresste Niederschlag wird in Sodalösung zur Injection verwandt. Derselbe enthält neben viel Heteroalbumose auch alle anderen bei verschiedener Ammonsulfatsättigung fällbaren Albumosen und Peptonfractionen.

4 g werden in 30 ccm. H<sub>2</sub>O bei alkalischer Reaction gelöst und einem 9,250 kg schweren Hunde intravenös injicirt.

Es trat keine Aenderung der Gerinnbarkeit ein. Aber auch eine nachträglich vorgenommene Kontrollinjection von Wittepepton war ohne Wirkung.

#### Versuch XIX.

##### Wirkung des alkohollöslichen Antheils des Wittepeptons.

Die alkoholische Lösung wurde zur Trockene eingedampft, die spröden, leimartigen Massen fein pulverisirt und behufs Injection in schwach alkalische wässrige Lösung gebracht. Die Lösung enthält ausser Protalbumose reichlich alkohollösliche Antheile aller Albumosen- und Peptonfractionen.

Angewandte Menge: 5,2 g, gelöst in 50 ccm.; Gewicht des Hundes: 10,2 kg.

Blutentnahme aus der a. femor.	Zeit der Gerinnung in Eprouvetten	Capillaren	
12 <sup>06</sup>	12 <sup>09</sup>	12 <sup>11</sup>	
12 <sup>09</sup> Injection, Blutdrucksenkung, Narkose			
12 <sup>15</sup>	12 <sup>30</sup>	12 <sup>19</sup>	} Fibrinolyse nach 1 Stunde
12 <sup>19</sup> Narkose vorbei, Blutdruck normal			
12 <sup>31</sup>	12 <sup>37</sup>	12 <sup>31</sup>	
	lockere Gerinnung		
12 <sup>33</sup>	12 <sup>37</sup>	12 <sup>35</sup>	
12 <sup>38</sup>	12 <sup>40</sup>	12 <sup>42</sup>	

#### Versuch XX.

##### Wirkung des mit Alkohol gekochten Wittepeptons.

200 ccm. einer 10 %igen Wittepeptonlösung wurden mit dem gleichen Volumen 95 %igen Alkohols gefällt, ca. 10 Stunden lang auf dem kochenden Wasserbade unter Rückfluss erhitzt und hierauf die gesamte Flüssigkeit in offener Schale auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft. Die Lösung des Trockenrückstandes reagirt neutral; dieselbe wird mit Soda schwach alkalisch gemacht und zur Injection verwandt.

Gewicht des Hundes beträgt 6 1/2 kg. Injicirt wurden 2,5 g in 10 ccm. H<sub>2</sub>O gelöst.

Blutentnahme aus der a. axillaris	Zeitpunkt der Gerinnung in der Eprouvette	Capillaren
12 <sup>05</sup>	12 <sup>07</sup>	—
12 <sup>05</sup> -12 <sup>07</sup> Injection in d. v. axillar.		
12 <sup>09</sup> Blutdruck stark gesunken. Narkose	12 <sup>18</sup> Auftreten einzelner Gerinnung <sup>1)</sup>	12 <sup>17</sup>
12 <sup>16</sup>	12 <sup>22</sup> „ „ „ 1)	—
12 <sup>21</sup> Blutdruck normal	12 <sup>24</sup> „ „ „	—
12 <sup>28</sup>	12 <sup>30</sup> „ „ „ 1)	—
12 <sup>39</sup>	12 <sup>40</sup> total geronnen	
12 <sup>45</sup>	12 <sup>48</sup> „ „	

1) Die Blutproben blieben ihrer Hauptmenge nach ungeronnen.

Wir führen absichtlich diesen Versuch als Beispiel dafür an, dass die Alkoholbehandlung nicht in allen Fällen die gerinnungshemmende Wirkung ganz beseitigt. — Vermuthlich ist die Dauer des Erhitzens, namentlich aber die Reaction von besonderem Einfluss.

Wir haben darauf verzichtet, unsere zahlreichen, mühsamen und kostspieligen Versuche in dieser Richtung bis zur Ausarbeitung eines stets wirksamen Verfahrens fortzusetzen, einmal, weil das Wittepepton sich uns als ein Präparat von wechselnder Zusammensetzung ergab, und ferner, weil das gewünschte Ziel später in einfacher und zuverlässiger Weise mit anderem Material erreicht wurde.

Da die bisher vorgeführten Erfahrungen sämmtlich an Wittepepton, also einem mit Pepsinsalzsäure gewonnenen Produkte, gemacht waren, empfahl es sich, Versuche weiterhin mit Material anzustellen, das ausschliesslich durch Säurewirkung gewonnen war.

Dabei konnte den Bedingungen, unter denen der Alkohol die gerinnungshemmende Substanz bzw. ihre Vorstufe zerstört, näher nachgegangen werden.

Es wurde demgemäss geprüft, ob

1. Fibrin schon als solches durch Alkoholbehandlung so verändert wird, dass es mit Säure keine gerinnungshemmende Substanz mehr liefert, oder
2. ob die durch Säure aus Fibrin erhältlichen wirksamen Produkte erst durch Alkohol ihre Wirkung einbüssen, wobei wieder auf den Einfluss der Reaction Bedacht genommen werden konnte.

#### Versuch XXI.

##### **Wirkung der Säureprodukte aus alkoholbehandeltem Fibrin.**

$\frac{1}{2}$  kg gut gewaschenen, frischen Fibrins wurde abgepresst, mit etwa  $1\frac{1}{2}$  Liter 95%igen Alkohols versetzt und im Kolben unter Rückfluss 24 Stunden hindurch auf dem Wasserbade gekocht, vom Alkohol durch sorgfältiges Abpressen befreit und mit 0,4%iger Salzsäure durch  $2 \times 24$  Stunden bei  $40^{\circ}$  digerirt. Die Flüssigkeit wurde dann vom ungelösten Fibrin durch Coliren getrennt, die schwachsaure Lösung durch längeres Kochen auf dem Wasserbade coagulirt, neutralisirt und vom ausgeschiedenen Acidalbumin abfiltrirt. Nach Einengen des Filtrates bis

zur Trockene wurde die Lösung des Trockenrückstandes zur Injection verwendet. Dieselbe enthielt alle bei der Säurespaltung nachgewiesenen Albumosen und Peptone in reichlicher Menge.

42 ccm. einer alkalischen, 8 g der Trockensubstanz fassenden Lösung wurden einem 9,5 kg schweren Hunde injicirt.

Sofort trat Narkose, Blutdrucksenkung und Verlangsamung der Athmung ein. Die nach der Injection entnommenen Blutproben blieben tagelang ungeronnen.

#### Versuch XXII.

Ein Theil des im vorigen Versuch erhaltenen Trockenrückstandes wird in Wasser gelöst und die sauer reagirende Lösung mit etwas mehr als dem doppelten Volumen 95%igen Alkohols gefällt und das Ganze im Kolben unter Rückfluss 24 Stunden lang auf dem Wasserbade gekocht. Ein grosser Theil der Produkte geht in die alkoholische Lösung. Dieselbe wird auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Lösung enthält neben Protoalbumose auch die übrigen durch Ammonsulfat schwer oder nicht fällbaren Spaltungsprodukte.

5 g dieser werden in 15 ccm.  $H_2O$  bei schwach alkalischer Reaction gelöst und einem 8 kg 300 g schweren Hunde in die vena femoralis eingespritzt.

Die unmittelbar nach der Injection entnommene Blutprobe gerinnt, zeigt aber nachträglich Fibrinolyse. Die weiteren im Laufe einer Viertelstunde entnommenen Blutproben blieben tagelang ungeronnen.

#### Versuch XXIII.

Fein zerhacktes Fibrin wird 24 Stunden in 95%igem Alkohol unter Rückfluss auf dem Wasserbade gekocht, hierauf durch mehrere Tage mit Verdauungssalzsäure im Brutschrank digerirt, die nach Coagulation und Abscheidung des Acidalbumins erhaltenen, sauer reagirenden Spaltungsprodukte in wässeriger Lösung mit Soda deutlich alkalisch gemacht und nochmals nach Zusatz des doppelten Volums 95%igen Alkohols durch 24 Stunden auf dem Wasserbade unter Rückfluss gekocht. Sowohl der Trockenrückstand der in Alkohol gelösten Produkte als auch der in Alkohol unlösliche Theil werden vereinigt und in Wasser gelöst. Die Lösung reagirt alkalisch. Ein Theil der Produkte bleibt auch bei alkalischer Reaction wasserunlöslich (Dysalbumose, die sich beim Kochen mit Alkohol reichlich gebildet hatte). Die wasserlöslichen Produkte gaben neben intensiver Biuret-, Millon's- und Molisch's-Reaction auch eine sehr starke Schwefelbleiprobe. Durch Aussalzen mit gesättigter Ammonsulfatlösung erhält man bei Zusatz des gleichen Volumens eine starke flockige Fällung, bei  $\frac{2}{3}$ -Sättigung und bei voller Sättigung der neutralen Lösung Trübung, und bei Sättigung der sauren Lösung Opalescenz. Das albumosenfreie Filtrat enthielt Peptone, die sich mit Jodquecksilberkalium und HCl fällen liessen.

Zu dem nachfolgenden Versuch wurden 2,8 g der wasserlöslichen Substanz verwendet. Dieselben, in 22 ccm.  $H_2O$  bei alkalischer Reaction gelöst, wurden einem 5 kg 200 g schweren Hunde in die vena femoralis injicirt.

Das Resultat war negativ: Es fehlte Narkose und Blutdrucksenkung. Die Gerinnungszeit des Blutes schien eher verkürzt. Auch Fibrinolyse fehlte. Aber auch eine 40 Minuten später ausgeführte Kontrollinjection von Wittepepton liess eine Blutwirkung vermissen.

Aus diesem und weiteren im gleichen Sinn ausgefallenen Versuchen lässt sich schliessen:

1. dass die gerinnungshemmende Substanz durch Alkohol in schwach alkalischer, nicht aber in saurer Lösung zerstört wird;
2. dass die gerinnungshemmende Substanz im Rohfibrin nicht präformirt sein dürfte, da sie trotz intensiver Alkoholbehandlung des Rohfibrins aus diesem nachträglich durch Säurebehandlung noch freigemacht werden kann.

Dies führt zu dem Wahrscheinlichkeitsschluss, dass das Rohfibrin nur eine Vorstufe des gerinnungshemmenden Körpers enthält, welche gegen Alkohol sehr resistent ist.

Diesen Schluss näher zu prüfen wird dadurch erschwert, dass weder das leicht veränderliche Fibrinogen, noch Fibrin selbst in irgend einer die Intactheit des Eiweisskörpers gewährleistenden Form in die Blutbahn gebracht werden kann. Ein Versuch mit Acidalbumin, das aus Fibrin bereitet war, hatte ein negatives Ergebniss.

#### Versuch XXIV.

Bei der Digestion mit Verdauungssalzsäure in Lösung gegangenes Fibrin wurde mit verdünnter Sodalösung neutralisirt und ein Theil des dabei ausgefallenen massenhaften Niederschlages in verdünnter Natronlauge gelöst. Trotzdem das verwandte Fibrin möglichst gründlich ausgewaschen worden war, ist dabei immer mit einer Verunreinigung von Körpern zu rechnen, die aus dem Blute bei der Gerinnung in das Fibrinmaschenwerk mit eingeschlossen wurden. Es dürfte demnach auch das von uns erhaltene Acidalbumin noch andere Bestandtheile des Blutes, insbesondere Globuline des Serums mit enthalten. Die durch Natronlauge in Lösung gebrachte Menge des Acidalbumins liess sich nicht genau bestimmen und kann nur schätzungsweise auf 1,5—2 g Trockengewicht angegeben werden.

Der zum nachfolgenden Versuch verwendete Hund wog 4 kg 200 g.

Die Injection hatte keinen Einfluss auf die Gerinnungszeit, und Fibrinolyse trat nicht ein.

Auch eine zur Kontrolle ausgeführte Injection von Wittepepton war ohne Einfluss auf die Blutgerinnung, doch trat Fibrinolyse auf.

Fasst man die Ergebnisse dieser Versuchsreihe ins Auge, so kommt man zu dem Schluss, dass die dem Wittepepton und den durch Säureeinwirkung erhaltenen Produkten des Rohfibrins zukommende Wirkung nicht den in diesen Gemengen enthaltenen typischen Albumosen und Peptonen zuzuschreiben ist, sondern einer diesen anhaftenden, leicht durch Alkohol zerstörbaren Beimengung.

Damit soll natürlich vorläufig nicht gesagt sein, dass der Stoff sicher nicht albumosenartiger Natur ist, da wir über seine chemische Beschaffenheit gar nichts auszusagen in der Lage sind und somit den Vermuthungen der freieste Spielraum offen steht.

---

Die Blutwirkung ist nur eine einzelne unter den mannigfachen oben erwähnten toxischen Wirkungen des Wittepeptons und der Säureprodukte des Fibrins überhaupt: das ausserordentlich mannigfaltige Vergiftungsbild nach Peptoninjection — Ungerinnbarkeit des Blutes, Lymphorrhöe, Aenderung im Trockengehalt von Blut und Lymphe, Blutdrucksenkung, Verminderung der Blutalkalescenz, Verschwinden der Leucocyten aus dem circulirenden Blute, Anurie, tiefe Narkose und endlich profuse Gallensecretion — lassen es nicht unwahrscheinlich erscheinen, dass es sich um eine Summation der Vergiftungsbilder mehrerer wirksamer Agentien handelt.

Durch Versuche zu entscheiden, ob die einzelnen Symptome der «Peptonwirkung» bestimmten Agentien zuzuschreiben seien, und die Natur dieser Agentien festzustellen, lag vorläufig ausserhalb unseres Versuchsplanes. Doch möchten wir an dieser Stelle einige einschlägige Beobachtungen anführen.

#### **I. Einfluss der Peptoninjection auf die Blutalkalescenz.**

Ueber diesen Punkt besteht eine recht umfangreiche, übrigens in ihren Resultaten sich mannigfach widersprechende



gegangen werden soll. Zahlreiche Versuche, die Herr Dr. W. Pemsel und der eine von uns mit einer Methode gemacht haben, die im Uebrigen bei Kontrollbestimmungen gut übereinstimmende Werthe ergab, führten bei Anwendung verschiedener Wittepeptonpräparate zu wechselnden Resultaten. Bei Anwendung gereinigter Präparate jedoch erhielten wir scharf mit einander übereinstimmende Zahlen, die an anderer Stelle dargelegt werden sollen, und die in dem Umfang, als die angewandte Methodik Alkalescenzdifferenzen anzugeben im Stande ist, zeigt, dass nach Injection reiner Proto- und Heteroalbumose die sonst beobachtete Blutalkalescenzverminderung nicht eintritt.

## II. Einwirkung auf die Lymphbildung.

### Versuch XXV.

Einem 20 kg schweren Hunde wird nach der Heidenhain'schen Methode in tiefer Narkose eine Lymphfistel am ductus thoracicus angelegt, die normaler Weise abgeschiedene Lymphmenge in der üblichen Weise in Zwischenräumen von 5 Minuten bestimmt und nach Injection der alkohollöslichen Produkte die Lymphmenge in analoger Weise wieder gemessen.

Vor der Injection betrug die Lymphmenge in 35 Minuten 37,5 ccm.; nach der Injection von 10 g des alkohollöslichen Antheils von Wittepepton in 50 ccm. alkalischer Lösung 62,4 ccm. in 56 Minuten.

Es hatte somit eine Vermehrung des Lymphflusses nicht stattgefunden.

Nach den angeführten Versuchen scheint die Alkoholbehandlung dem <Pepton>-Gemenge neben der Wirkung auf die Blutgerinnung auch jene auf die Lymphbildung und auf die Blutalkalescenz zu nehmen. Aus den früher angeführten, am Kymographion angestellten Versuchen scheint das Gleiche auch für den Blutdruck, und ebenso auch für die Narkose zu gelten.

Hervorgehoben sei ferner noch die beachtenswerthe Thatsache, dass in einer Reihe von Versuchen (z. B. XIV, XV, XVI, XVII, XVIII), wo die Versuchshunde mit Alkohol behandelte Albumosen injicirt erhielten, die hinterher ausgeführte Injection von Wittepepton in Betreff der Gerinnungswirkung

durchaus erfolglos war. Da von Haus aus peptonimmune Thiere bei geeigneter Vorbehandlung durchaus selten sind, wie ich mich in den letzten Jahren an einem weit über 100 Thiere umfassenden Material überzeugt habe, so kann dieses Vorkommniß, das die Kontrollprüfung zum Theil vereitelte, nur so gedeutet werden, dass die Injection der an sich unwirksamen Präparate doch genügte, die Thiere gegen wirksames Pepton immun zu machen; hierfür bringen andere noch anzuführende Versuche weiteres Material bei.

## V.

### Ueber Vorkommen und Eigenschaften von gerinnungshemmenden Stoffen in den Geweben.

Wie aus der Eingangs gegebenen Uebersicht hervorgeht, hat man sich bisher bei Aufsuchung der gerinnungshemmenden Substanz unter den Spaltungsprodukten von Rohfibrin, Eiereiweiss u. s. w. fast ausschliesslich der fermentativen Spaltung (vorwiegend mit Pepsin, selten mit Trypsin und Pepsin) bedient. Da nun die angewandten Fermentpräparate in sich selbst die Vorstufe der gerinnungshemmenden Substanz beherbergen können (man vergleiche weiter unten die Erfahrungen über Säuredigestion der Magenschleimhaut), so sind, wie schon angedeutet wurde, die damit gewonnenen Erfahrungen nicht unzweideutig.

Diesem Vorwurfe ist die von uns angewandte Digestion mit verdünnter (Verdauungs-) Salzsäure (ohne Pepsinzusatz) nicht ausgesetzt. Sie bietet daher ein treffliches Mittel, der Herkunft des im Fibrin enthaltenen gerinnungshemmenden Agens, bezw. seiner zymogenähnlichen Vorstufe, nachzuspüren. Denn die Vermuthung, dass diese Substanz nicht im Blute entsteht, sondern ihm von den Geweben zugeführt wird, liegt äusserst nahe.

Wir haben daher eine Reihe von Organen in dieser Richtung untersucht:

Als Material benutzten wir dabei die leicht erhältlichen Organe vom Rind oder Schwein, wie sie vom Schlachthaus bezogen werden.

Ein vollkommen negatives Resultat lieferten Thymus,

Hoden, Nebennieren und Milz, Submaxillärdrüse, Lymphdrüsen und Oesophagusschleimhaut. Obgleich, wie die folgenden Ausführungen zeigen, die erhaltenen Präparate besonders reich an (primären) Albumosen und Peptonen waren, so trat bei ihrer Injection doch keine oder nur eine verschwindende Wirkung ein.

#### Versuch XXVI.

##### Stierhoden.

2 frische Stierhoden werden zerkleinert und der Säuredigestion durch 12 Stunden ausgesetzt, die Digestionsflüssigkeit nach Entfernung des coagulablen Eiweisses und des beim Neutralisieren ausgefallten Acidalbumins bei neutraler Reaction auf dem Wasserbade eingedampft. Die so erhaltenen Produkte gaben neben einer schönen Biuret- und Molisch'schen Probe eine besonders intensive Millon'sche Reaction und starke Dunkelfärbung beim Kochen mit Bleiacetat und Natronlauge. Mitteltst Aussalzung durch Ammonsulfat waren neben sehr reichlich vorhandenen sogenannten primären Albumosen und bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung und voller Sättigung der neutralen und sauren Lösung ausfällbaren « secundären » Albumosen ebenfalls Peptone nachweisbar.

4 g der Säureprodukte des Hodens werden in 17 ccm. einer etwas alkalischen Lösung einer 8 kg schweren Hündin beigebracht. Es tritt weder Narkose noch Blutdrucksenkung ein, das Blut zeigt dauernd die gewöhnlichen Gerinnungsverhältnisse. Auch Fibrinolyse fehlt.

Das Thier war, wie eine vor einer Woche vorgenommene Pepton-injection gelehrt hatte, nicht peptonimmun.

#### Versuch XXVII.

##### Thymus.

1 Stück Kalbsthymus wird mit der Hackmaschine fein zerkleinert und bei Bruttemperatur über Nacht der Säuredigestion unterworfen. Morgens wird dieselbe unterbrochen und die Flüssigkeit in der gewöhnlichen Weise behandelt. Man erhält eine relativ bedeutende Menge von Spaltungsprodukten, die sich grösstentheils mit saurer Reaction in Wasser glatt lösen; die Lösung gibt intensive Biuretreaction, ebenso die nach Millon und Molisch, enthält mit Blei in alkalischer Lösung abspalzbaren Schwefel und neben reichlichen Mengen aller mit Ammonsulfat fällbaren Fractionen auch mit Jodjodkalium und Jodquecksilberkalium mit HCl fällbare Peptone. Diese Produkte, mit Soda schwach alkalisch gemacht, wurden zum nachfolgenden Versuch verwandt: Ein Hund vom Gewichte 5 kg 200 g, der durch eine mehrere Tage vorausgehende Witte-peptoninjection als nicht natürlich-immun erkannt worden war, erhielt intravenös 25 g obiger Produkte in 15 ccm. fassender, alkalischer Lösung.

Narkose und Blutdrucksenkung. Blutgerinnbarkeit bleibt normal. Fibrinolyse fehlt.

## Versuch XXVIII.

### Nebennieren.

50 Stück gut zerhackter Rindsnebennieren wurden 2×24 Stunden der Säuredigestion unterworfen und dann in üblicher Weise aus der Digestionsflüssigkeit die Spaltungsprodukte isolirt, die nach der oben angewandten Spaltungsdauer bereits in erheblicher Menge gebildet waren. Dieselben stellten nach dem Eindampfen eine dunkelbraune, syrupöse Masse dar, deren wässrige Lösung sauer reagierte, Millons-, Molisch's-Reaction gab und beim Kochen mit alkalischem Bleiacetat sich braun färbte und schwarzen Bodensatz von ausgeschiedenem Schwefelblei lieferte. Die rothviolette Farbe der Biuretreaction wurde durch die Gelbbraunfärbung der Lösung verdeckt. Mittelst Ammonsulfat liessen sich durch Halbsättigung fällbare Albumosen nachweisen, ebenso trat bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung der Lösung reichliche flockige Fällung auf. Sättigung der neutralen Lösung schied spärliche Flocken ab und trübte die Flüssigkeit, Säurezusatz erzeugte Opalescenz. In dem albumosenfreien Filtrate fanden sich reichlich Peptone, wie aus der angestellten Biuretreaction und der dichten Trübung nach Zusatz von Jodquecksilberkalium mit HCl hervorging. Die Lösung färbte sich auf Zusatz von Eisenchlorid schön grün; die Grünfärbung schlug nach Hinzufügen von 2 Tropfen einer Sodalösung in ein prachtvolles Rothviolett um. Es war also auch die durch diese Reactionen charakterisirte blutdrucksteigernde Nebennierensubstanz vorhanden.

Ueber 2 g des obigen Syrups wurden in 10 ccm. H<sub>2</sub>O gelöst, die Lösung schwach alkalisch gemacht und einem 3 kg schweren Hunde, der sich bereits früher auf Albumoseninjection empfindlich erwiesen hatte, intravenös injicirt.

Nach 4 Minuten Herzstillstand. Das inzwischen aus der Carotis entnommene Blut zeigt weder Verminderung der Gerinnbarkeit, noch Fibrinolyse. Die sogleich vorgenommene Eröffnung des Brustkorbs liess weder im rechten Herzen noch in den grossen Gefässstämmen Gerinnsel erkennen.

Ob die sonst bei keinem der untersuchten Produkte angetroffene letale Giftwirkung, wie zu vermuten, auf das in der Lösung nachweisbare «Suprarenin», bei dessen Einführung in grosser Menge in die Blutbahn v. Fürth<sup>1)</sup> schwere Vergiftungserscheinungen beobachtete, oder auf die Wirkung von Säurespaltungsprodukten zurückzuführen ist, ist bei der Unmöglichkeit, nachträglich die Menge des injicirten Suprarenins abzuschätzen, nicht sicher zu entscheiden.

## Versuch XXIX.

### Submaxillaris.

2 Stück der Unterkieferspeicheldrüsen des Rindes wurden fein zerhackt, mehrere Tage mit 0,4%iger HCl bei Bruttemperatur digerirt,

1) Vgl. diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 105, 1899.

die schwach saure Flüssigkeit aufgekocht, neutralisirt, vom ausgefallenen Eiweisscoagulum und Acidalbumin filtrirt und auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft. Die so erhaltenen Produkte bestanden zum allergrössten Theil aus Albumosen, zum kleinsten aus Peptonen und höheren Spaltungsprodukten und gaben Biuretreaction, Millon's Reaction, Reaction nach Molisch (schön violett) und schwache Braunfärbung nach Kochen mit Bleiacetat in alkalischer Lösung. Durch Ammonsulfat liessen sich bei halber,  $\frac{2}{3}$  und voller Sättigung der neutralen Lösung reichliche Albumosenniederschläge erhalten. Die albumosenfreie Lösung gab Biuretreaction und milchige Trübung nach Zusatz von Jodquecksilberkalium mit HCl.

Von diesen Produkten wurden 4,5 g in 10 ccm. betragender wässeriger, schwach alkalischer Lösung intravenös injicirt. Gewicht des Hundes betrug  $6\frac{1}{2}$  kg.

Es trat weder Verzögerung der Blutgerinnung noch sonst ein Vergiftungssymptom auf.

Eine nachträglich vorgenommene Injection von Wittepepton lehrte, dass das Thier nicht peptonimmun war.

#### Versuch XXX.

##### **Lymphdrüsen.**

Halslymphdrüsen des Rindes, in üblicher Weise vorbehandelt, wurden durch einige Tage der Säuredigestion unterworfen und die Digestionsflüssigkeit wie früher bearbeitet. Die schliesslich erhaltenen Produkte gaben eine positive Millon'sche- und Biuretreaction und eine deutliche Reaction nach Molisch; der Ausfall der Schwefelbleiprobe blieb zweifelhaft. Durch Salzzusatz wurden Albumosen bei halber,  $\frac{2}{3}$  wie auch bei voller Sättigung der neutralen Lösung mit Ammonsulfat in dichten Fällungen ausgeschieden. Säurezusatz erzeugte in der salzgesättigten Lösung eine Opalescenz. Das albumosenfreie Filtrat enthielt Körper, die mit Jodquecksilberkalium und Salzsäure zu fällen waren und Biuretreaction zeigten.

$4\frac{1}{2}$  kg schwerer Hund. Die zur Injection verwandte Menge betrug 5 g in 12,5 ccm.  $H_2O$ . Die Lösung reagirte schwach alkalisch.

Der Injection folgt rasch vorübergehende, tiefe Narkose bei unverändertem Blutdruck. Die Gerinnbarkeit des Blutes bleibt unverändert.

Eine nachträglich vorgenommene Einspritzung von Wittepepton ergibt die typische Wirkung.

#### Versuch XXXI.

##### **Oesophagusschleimhaut.**

Die von der Muscularis abgelöste Schleimhaut der Speiseröhre des Rindes wurde nach vorhergegangener Reinigung fein zerhackt, eine Woche lang der Säuredigestion im Brutschrank ausgesetzt und in üblicher

Weise weiter behandelt. Die erhaltenen, vom coagulablen Eiweiss und Acidalbumin befreiten Produkte lösten sich zum grössten Theil leicht in Wasser; die in Wasser gelösten Körper waren durch Biuret-, Millon's und Molisch's Reaction characterisirt und gaben auch eine schwache Schwefelbleireaction in alkalischer Lösung. Mittelst Ammonsulfats erhielt man bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung der neutralen Lösung massenhafte Fällung; bei  $\frac{2}{3}$ -Sättigung Opalescenz und bei voller Sättigung wiederum reiche flockige Abscheidung. Säurezusatz zur gesättigten, neutralen Lösung erzeugte eine kaum merkliche Opalescenz. Die durch Ammonsulfatsättigung von Albumosen befreite Lösung gab eine nur schwache Biuretreaction, reichliche Abscheidung auf Zusatz von Jodquecksilberkalium mit HCl, enthielt also noch weitere Produkte der Säurespaltung.

Hund,  $4\frac{1}{2}$  Kilo schwer; 2,5 g in 10 ccm. Wasser gelöst und mit Soda schwach alkalisch gemacht gelangten zur Injection.

Weder Narkose noch Blutdruckwirkung. Die Blutgerinnbarkeit ändert sich nicht. Eine  $\frac{1}{2}$  Stunde später vorgenommene Einspritzung von Wittepepton gibt typische Wirkung.

Diesen negativen Ergebnissen stehen die mit Magen-, Dünndarm-, Dickdarm-Schleimhaut und mit Pankreas erhaltenen positiven Befunde gegenüber.

## Versuch XXXII.

### Magenschleimhaut.

Die Schleimhaut zweier Schweinemägen wurde von der Muskelschicht abpräparirt, fein zerhackt und durch 3 Tage im Brutschrank in 1 Liter 4%iger HCl digerirt. Die Lösung, in gewöhnlicher Weise behandelt, lieferte reichlich Spaltungsprodukte von nachfolgendem Verhalten: Sie waren leicht löslich in Wasser, gaben intensive Biuret-, Millon's und Molisch's Reaction und enthielten reichlich mit alkalischem Blei in der Wärme abspaltbaren Schwefel. Die fractionirte Fällung mit Ammonsulfat ergab auf Zusatz von

gleichem Volumen gesätt. Lösung Opalescenz	Doppeltem Volumen gesätt. Lösung starke Opalescenz	bei Sättigung d. neutr. Lösung massenhafte flockige Fällung	bei Sättigung d. saur. Lösung Opalescenz
--	--	--	--

Das Filtrat nach Abscheidung der Albumosen gab eine schöne Biuretreaction und Fällung bei Zusatz von Jodquecksilberkalium mit Salzsäure.

Von diesem vorliegenden Albumosenpeptongemenge wurden 24 ccm. einer schwach alkalischen, 5 g Trockensubstanz enthaltenden Lösung einem 8250 g schweren Hunde intravenös beigebracht.

## Normalprobe

10<sup>09</sup>—10<sup>11</sup> Injection in die  
v. femoralis

10<sup>12</sup>10<sup>18</sup> später Fibrinolyse10<sup>17</sup>

{ Blut stark viscos, bleibt tagelang ungeronnen  
{ tiefe Narkose

10<sup>22</sup>

bleibt durch 2 nachfolgende Tage ungeronnen

10<sup>26</sup>

am zweitnächsten Tage erst geronnen

10<sup>28</sup>

der gleiche Befund.

Hund nach Beendigung des Versuches somnolent, erholt sich auch  
später nicht und wird um 2 Uhr todt im Käfig aufgefunden.

## Versuch XXXIII.

## Dünndarmschleimhaut.

Die sorgfältig gewaschene Dünndarmschleimhaut des Rinderdarmes  
gelangte in gleicher Weise wie die Dickdarmschleimhaut zur Verarbei-  
tung. Auch hier betrug die Digestionsdauer 4 Wochen. Die am Schlusse  
erhaltenen Spaltungsprodukte gaben eine schöne Biuretreaction, keine  
Reaction nach Millon und Molisch. Durch Ammonsulfat war bei den  
verschiedenen Sättigungsgraden nur eine Opalescenz der Lösung zu be-  
wirken. Das saure, salzgesättigte Filtrat gab Biuretreaction und Fällung  
auf Zusatz von Jodquecksilberkalium mit Salzsäure. Gewicht des Hundes:  
4 1/2 kg. Die injicirte Menge betrug 1 g gelöst in 5 ccm H<sub>2</sub>O.

Blutentnahme

a. d. a. femor.

11<sup>57</sup>

Zeitpunkt der Gerinnung

in d. Eprouvette Capillare

11<sup>58</sup>11<sup>58</sup>

## Normalprobe

12<sup>08</sup> Injection in die  
v. femor.

Im Moment der In-  
jection clonisch-tonische  
Krämpfe

12<sup>08</sup> Blutdruck normal, Narkose1<sup>07</sup>12<sup>26</sup>

nachträglich Fibrinolyse

12<sup>09</sup>12<sup>17</sup> Narkose vorbei

{ alle Proben

{ Meiben

{ ungeronnen

{ 1<sup>58</sup>

{ Die Proben

{ wurden

{ 1<sup>30</sup> geronnen

{ vorgefunden

12<sup>26</sup>

## Versuch XXXIV.

## Dickdarmschleimhaut.

Gründlich ausgewaschene Dickdarmschleimhaut wurde von der  
Muscularis abgeschabt, fein zerhackt und der Säuredigestion bei Brut-  
temperatur unterworfen. Die Digestionsdauer betrug 4 Wochen. Nach

dieser Zeit waren nur Spuren coagulablen Eiweisses in der Lösung zurückgeblieben, der grösste Theil derselben war weiter gespalten worden. Die Flüssigkeit wurde bei schwach saurer Reaction aufgekocht, neutralisirt, von dem spärlichen Niederschlag filtrirt und auf dem Wasserbade zur Trockene eingedampft. Der Trockenrückstand löste sich bis auf einen geringen Rest glatt in Wasser. Die wässrige Lösung verhielt sich folgendermaassen: Bei Anstellung der Biuretreaction erfolgte auf Zusatz von verdünntem Kupfersulfat Fällung, die sich bei Laugenzusatz löste; die Lösung zeigte einen schwachen rothbraunen Farbenton. Millon's Reagens erzeugte eine Trübung und schwache flockige Fällung. Die Flocken färben sich selbst bei langem Kochen nur leicht braun; die Lösung selbst bleibt gelb gefärbt. Auch die Reaction nach Molisch bleibt negativ. Die Schwefelbleiprobe ergibt eine leichte Braunfärbung der Lösung. Bei Salzfüllung durch Ammonsulfat erhielt man bei

Halbsättigung	$\frac{2}{3}$ -Sättigung	Ganzsättigung
Opalescenz	Opalescenz	spärliche, flockige Abscheidung

Das saure salzgesättigte Filtrat gab keine Biuretreaction, dagegen Fällung auf Zusatz von Jodquecksilberkalium.

Aus diesen Reactionen ergibt sich, dass der grösste Theil der Spaltungsprodukte weder den Albumosen noch den Peptonen zuzurechnen ist, sondern in die Gruppe der nicht mehr die Biuretreaction gebenden Körper<sup>1)</sup> fällt. Sowohl Albumosen, wie auch Peptone waren einwandfrei nur in der geringsten Menge, wenn überhaupt nachweisbar.

Gewicht des Hundes:  $4\frac{1}{2}$  kg. 2 g der Trockensubstanz in 10 ccm. gelöst wurden zur Injection verwandt.

Blutentnahme		Zeitpunkt der Gerinnung	
a. d. a. femor.		Eprouvette	Capillare
11 <sup>45</sup>		11 <sup>47</sup>	11 <sup>47</sup>
	11 <sup>55</sup> Injection in d. vena femor.		
11 <sup>57</sup>	tiefe Narkose, Blutdruck unverändert	} alle Blutproben bleiben bis zur ein- getretenen Fäulniss ungeronnen.	
12 <sup>05</sup>			
12 <sup>11</sup>			
12 <sup>30</sup>			

## Versuch XXXV.

### Pancreas.

2 Stück Rinderpancreas werden gut zerhackt und durch 24 Stunden mit 0,4% iger Salzsäure bei 40° stehen gelassen, hierauf die Lösung abcolirt, filtrirt, durch Aufkochen coagulirt, das Filtrat genau neutralisirt und auf

<sup>1)</sup> S. R. Zunz, Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XXVIII, S. 132.



dem Wasserbade eingedampft. Das so in reichlicher Menge gewonnene, etwas hygroskopische Produkt war leicht in Wasser löslich, die Lösung reagierte sauer, gab eine schöne Biuret- und Millon'sche Reaction, intensiv violett gefärbte Probe nach Molisch und mit verdünntem Bromwasser Fällung und Violettfärbung, beim Kochen mit Bleiacetat und Natronlauge starke Schwefelblei-Abscheidung. Gesättigte Ammonsulfatlösung erzeugte bei Zusatz von

gleichem Vol.	doppeltem Vol.	bei voller Sättg.	bei voller Sättg.
Trübung	Trübung	der neutr. Lösung	der saur. Lösung
		flockige Fällung	deutl. feinfl. Niederschl.

Das Filtrat nach Ausfällung der Albumosen gab Biuretreaction und trübte sich nach Jodquecksilberkalium und Säurezusatz. Es waren also reichlich Albumosen und Pepton vorhanden. Von diesem Produkte wurden 7,5 g in 25 ccm. gelöst zum nachfolgenden Versuch verwandt:

#### Intravenöse Injection beim Hunde.

Gewicht des Thieres 9 kg.

Blutentnahme		Zeitpunkt der Gerinnung	
a. d. a. femor.		Eprouvete	Capillare
4 <sup>47</sup>		4 <sup>52</sup>	4 <sup>52</sup>
Normalprobe			
4 <sup>48</sup> —4 <sup>50</sup> Inject. in d. v. femor.			
4 <sup>51</sup>		5 <sup>00</sup>	5 <sup>00</sup> { weiches Gerinnsel, später tritt Fibrinolys auf.
4 <sup>54</sup>	Narkose, Athmung langsam und tief	{ bleibt durch 2 nachfolg. Tage ungeronnen.	
5 <sup>00</sup>		{ bleibt den nächstfolg. Tag ungeronnen.	
5 <sup>05</sup>		der gleiche Befund	
5 <sup>11</sup>		" " "	
5 <sup>17</sup>		{ am nächsten Tag geronnen vorgefunden.	

Die vorggeführten Versuche genügen, um zu zeigen, dass gerinnungshemmende Stoffe, bezw. ihre Vorstufen bei den höheren Wirbelthieren nicht bloss im Blute vorkommen, sondern eine grosse Verbreitung besitzen. Eine bestimmte Beziehung dieses Vorkommens zu den einzelnen Organen lässt sich daraus vorläufig nicht mit Sicherheit entnehmen.

Es macht zwar den Eindruck, dass die Drüsen des Verdauungstractus einschliesslich der demselben zugehörigen grossen Drüsen besonders reich an Vorstufen des gerinnungshemmenden Stoffes sind, doch bildet die Unterkieferspeichel-

drüse und, wie weiter noch erörtert werden soll, die Leber eine Ausnahme.

Hingegen sieht man deutlich, dass dort, wo die Gerinnungswirkung sich nachweisen lässt, auch die anderen typischen Symptome der «Pepton»-Vergiftung nicht fehlen. Insbesondere ist die hohe Giftigkeit des aus Magenmucosa dargestellten Präparates bemerkenswerth.

Weiter geht aber aus diesen Versuchen hervor, dass die gerinnungshemmende und toxische Wirkung dem Gehalt an Albumosen und Pepton ganz und gar nicht parallel geht. So war die bei wochenlanger Digestion der Darmschleimhaut mit Salzsäure erhaltene, stark wirksame Lösung fast vollkommen frei von Albumosen und Peptonen. Die Spuren, die von diesen beiden Körperklassen nach den Fällungs- und Farbenreactionen noch anwesend waren, können jedenfalls nicht als Ursache der Gerinnungshemmung angesehen werden, so dass auch durch diese Versuche gezeigt ist, dass nicht den Verdauungsprodukten als solchen eine gerinnungshemmende Wirkung zukommt, sondern einer beigemengten, möglicher Weise in sehr kleiner Menge vorhandenen, aber sehr wirksamen Substanz.

Dies geht auch aus einem Befunde hervor, den hier mitzuthellen uns Herr Dr. Conradi gestattet hat. Presssäfte mancher ganz frischen Organe bewirken bei intravenöser Einspritzung sehr ausgesprochene Verzögerung der Blutgerinnung. Nun sind aber erfahrungsgemäss frische Gewebe (vom Verdauungsschlauch und Pankreas abgesehen) frei von typischen Albumosen und Peptonen; es kann sich somit auch hier nur um eine anderweitige, specifisch in dieser Richtung wirksame Substanz handeln.

Fasst man die bisher vorgeführten Thatsachen kurz zusammen, so ergibt sich:

1. Es gelingt durch Eiweisspaltung (z. B. durch Trypsin, Autolyse, Alkali, bei Casein und Edestin auch durch Säure) typische Albumosen und Peptone zu erhalten, welche ins Blut injicirt jeden Einfluss auf den Blutdruck vermissen lassen. Aber auch die durch Säure oder Pepsin und Säure dargestellten,

typischen wirksamen Produkte verlieren durch eine wenig eingreifende Reinigung (Behandlung mit Alkohol) ohne Einbusse ihres chemischen Charakters diese Wirksamkeit.

2. Es gelingt, Präparate zu erhalten, welche die gerinnungshemmende Wirkung in ausgesprochenem Maasse und ausgezeichnete Weise entfalten, dabei aber nur Spuren von Albumosen und Peptonen (z. B. Dickdarmschleimhaut) oder gar keine enthalten (Presssäfte frischer Organe).

Oder kurz in der hier meist üblichen Redeweise:

Es gibt «Peptone» ohne «Peptonwirkung» und «Peptonwirkung» ohne «Peptone».

Unter diesen Verhältnissen ist es behufs Vermeidung von Irrthümern nothwendig, von der üblichen Bezeichnungswiese abzugehen. Ohne über die Natur dieser ausserordentlich wirksamen Substanz etwas Näheres aussagen zu wollen, möchten wir der Kürze halber einen Namen für dieselbe wählen, und da über ihre chemische Natur bis jetzt etwas auszusagen unmöglich ist, scheint uns zur vorläufigen Bezeichnung ein Name am geeignetsten, der an die Geschichte der Substanz anklingt: die uns von Herrn Prof. Hofmeister vorgeschlagene Bezeichnung «Peptozym». Dass mit diesem Namen auch über die Einheitlichkeit der supponirten Substanz, bezw. die Identität der aus verschiedenem Material erhaltenen, nichts ausgesagt sein soll, braucht kaum besonders betont zu werden. Die Muttersubstanzen, aus welchen das Peptozym des Fibrins, der Leber etc. erhalten werden kann, dürften dann vorläufig als «Peptozymogene» bezeichnet werden können.

Ueber die allgemeinen Eigenschaften des Peptozyms gestatten die bisherigen Versuche immerhin Einiges auszusagen, dabei haben wir vor Allem das am genauesten untersuchte Peptozym des Fibrins im Auge.

Charakterisirt ist es durch die Fähigkeit, bei intravenöser Injection das Blut des Hundes ungerinnbar zu machen (indirekte Gerinnungshemmung), während es dem aus der Ader gelassenen Blut beigemengt ohne Wirkung ist.

Es ist selbst gegen lang dauernde Einwirkung von schwachen Mineralsäuren resistent, ebenso auch gegen Er-

wärmen in neutraler resp. schwach alkalischer Lösung. Eine Resistenz auch gegen Papainverdauung lehren ferner die oben erwähnten Untersuchungen Chittenden's und seiner Mitarbeiter.

Gegen Alkali ist die Substanz jedenfalls empfindlicher als gegen Säuren; so wird sie durch längere Behandlung mit freiem, sehr verdünntem Alkali zerstört. Noch grösser scheint diese Empfindlichkeit der Substanz gegen Alkali zu sein, wenn nicht in wässriger, sondern in alkoholischer Lösung gearbeitet wird. Denn während die Substanz durch Kochen mit Alkohol in saurer oder neutraler Lösung nicht zerstört wurde, sahen wir sie ihre Wirksamkeit bald verlieren, als sie in einem Kontrollversuche in alkalischer Lösung gekocht wurde.

Im Rohfibrin ist das Peptozym, wie oben erwähnt, vermuthlich nicht als solches, sondern in Form einer Vorstufe vorhanden, als «Peptozymogen», das der Einwirkung des Alkohols und der Autolyse widersteht, ähnlich wie sich nach Untersuchungen von Herrn Dr. Karl Glaessner aus Prag im hiesigen Institut, die uns Herr Prof. Hofmeister mittheilte, das Zymogen des Labs und des Pepsins durch eine sehr bedeutende Resistenz — im Vergleich zu den daraus erhältlichen Fermenten — auszeichnet.

## VI.

### Vergleich der Wirkung des Peptozyms mit jener anderer die Gerinnung beeinflussender Factoren des Organismus.

Durch eine grosse Reihe von Forschern ist in den letzten Jahren nachgewiesen, dass zwischen der Einwirkung von Blut-egalextract und «Pepton» auf die Blutcoagulation ein fundamentaler Unterschied besteht: Während in den Köpfen der Blutegel ein direkt die Coagulation hemmender Stoff vorhanden ist, wird (Fano) unter dem Einfluss des «Peptons» erst eine Verbindung gebildet, welche dem Blut die Befähigung zum Gerinnen raubt.

Bezeichnet man, einem jetzt herrschenden Sprachgebrauch folgend, solche direkt, also auch in vitro, die Wirkung des

Fibrinolytisches (Thrombin) aufnehmende Stoffe als «Antithrombine», so lässt sich dieser Befund so ausdrücken, dass die Blutegel ein Antithrombin enthalten, das Peptozym aber erst im Organismus das Auftreten eines Antithrombins veranlasst.

Als dasjenige Organ, welches nach der Peptoninjection das Antithrombin bereitet, ist von vielen Autoren (Gley, Contejean, Starling, Hédon und Delezenne, Spiro und Ellinger), die Leber erkannt worden.

Auf Grund dieser Thatsachen hat vor Kurzem M. Jacoby<sup>1)</sup> im hiesigen Institut direkte Beziehungen der Leber zur Blutgerinnung nachzuweisen gesucht. Er fand aber, dass proteolytisch wirksamer Lebersaft, intravenös injicirt, nicht gerinnungshemmend wirke, dass ferner dialysirter Lebersaft fibrinolytisch wirke, nicht dialysirter Lebersaft aber zwar eine geringe Antithrombinwirkung in vitro aufweise, eine nachträgliche Fibrinolyse aber vermissen lasse.

Trotzdem sich in diesen Versuchen nur eine geringe Einwirkung der Leber auf die Gerinnung erkennen liess, haben wir doch einige Versuche über die Einwirkung von Säuren auf Leber angestellt, da ja die Peptonwirkung als eine Ausschwemmung von präformirtem Antithrombin angesehen und auch mit jenen bekannten Experimenten in Analogie gebracht werden konnte, in denen das in der Leber aufgestapelte Glykogen unter dem Einfluss von Giften als Traubenzucker ausgeschwemmt wird; findet ja doch auch thatsächlich bei der Peptoninjection Vermehrung des Leberlymphflusses und der Gallensecretion statt.

Bei der Einwirkung der Säure auf die Leber fiel uns zunächst der abnorm schnelle chemische Verlauf der Spaltung auf. Trotzdem wir, wie in den anderen Versuchen, nur eine 0,4%ige Salzsäure anwandten, ging sichtbar ein grosser Theil des Lebereiweisses bald in Lösung, während ein anderer Theil desselben der Verdauung dauernd widerstand. Die Beschaffenheit der Lösung geht aus der ausführlichen chemischen Be-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 169. 1900.

schreibung hervor, die zeigt, wie weit in kurzer Zeit die Spaltung der Eiweisskörper gegangen war.

#### Versuch XXXVI.

$\frac{1}{2}$  kg frischer Rindsleber wird fein zerhackt und mit Verdauungssalzsäure  $1\frac{1}{2}$  Tage bei Bruttemperatur gehalten. Auffallenderweise erwies sich nach dieser kurzen Säurebehandlung der allergrösste Theil der Lebereiweisskörper gelöst und auch nicht durch Neutralisirung als Acidalbumin oder durch Coagulation ausfällbar. Die klare, gelblich gefärbte Flüssigkeit, auf dem Wasserbade eingengt, stellt braune, hygroscopische Massen dar, die sich leicht in Wasser lösen und schwach sauer reagiren. Ammonsulfat vermag bei keinem Sättigungsgrade, selbst nicht bei saurer Reaction, eine Fällung oder Trübung der Lösung zu erzeugen; 95%iger Alkohol fällt die wässrige Lösung. Essigsäure erzeugt eine im Ueberschusse des Reagens sich lösende Fällung, auf Zusatz von Ferrocyankalium Grünfärbung. Biuretreaction blieb negativ. Millon's Reagens färbte die Lösung beim Kochen schön roth, Molisch's Reaction verlief positiv; Reduction beim Kochen mit alkalischer Kupferlösung liess sich nicht nachweisen. Bromwasser erzeugte schwache Trübung und geringe Violettfärbung; bei vorsichtigem Erwärmen mit alkalischer Bleiacetatlösung trat Braunfärbung durch abgeschiedenen Bleischwefel ein. Phosphorwolframsäure, Gerbsäure, Pikrinsäure, Zinkacetat, Uranylacetat, Jodquecksilberjodkalium in saurer Lösung brachten Fällungen hervor. Nessler's Reagens liess nur Spuren Ammoniak erkennen, dagegen trat nach Erwärmen mit Magnesia starke Ammoniakentwicklung ein.

Die angeführten Reactionen zeigen, dass die Säurespaltung der Lebereiweisskörper sich in überraschend schneller Weise vollzieht; nach  $1\frac{1}{2}$  tägiger Digestion waren ausser nucleinartigen Körpern keine irgendwie als Eiweisskörper zu charakterisirenden Spaltungsprodukte nachweisbar, sondern nur Körper, die jenseits der Phase der Albumosen und Peptonbildung lagen und wohl in Analogie mit den von Zunz<sup>1)</sup> bei der Pepsinverdauung gefundenen und von Pfaundler<sup>2)</sup> charakterisirten Körpern zu bringen sind.

#### Intravenöse Injection beim Hunde.

14 g der Substanz wurden in 34 ccm.  $H_2O$  gelöst, mit Soda schwach alkalisch gemacht und zur Injection verwandt. Das Gewicht des Hundes betrug 9 kg.

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 132. 1899.

2) Ibidem, Bd. XXX, S. 90. 1900.

4 <sup>30</sup> Normalprobe	4 <sup>38</sup>	4 <sup>38</sup>	
4 <sup>38</sup> Injection v. 9 cem. d. Lg.		4 <sup>38</sup>	{ <div>           sogleich nach der Gerinnung            theilweise Verflüssigung            rasch nach der Gerinnung            völlige Wiederauflösung            sogleich eintretende theilweise            Verflüssigung         </div>
4 <sup>34</sup>	4 <sup>30</sup>	4 <sup>38</sup>	
4 <sup>37</sup> Injection v. 9 cem. d. Lg.		4 <sup>38</sup>	
4 <sup>38</sup>	4 <sup>45</sup>	4 <sup>38</sup>	
4 <sup>39</sup> Injection v. 9 cem. d. Lg.		4 <sup>40</sup>	
4 <sup>30</sup>	4 <sup>45</sup>	4 <sup>40</sup>	} <div>           Alle Proben            zeigen nach            einiger Zeit            völlige Ver-            flüssigung.         </div>
4 <sup>38</sup> Injection v. 9 cem. d. Lg.		4 <sup>45</sup>	
4 <sup>34</sup>	4 <sup>45</sup>	4 <sup>45</sup>	
4 <sup>41</sup>	4 <sup>54</sup>	4 <sup>50</sup>	
4 <sup>47</sup>	5 <sup>00</sup>	4 <sup>56</sup>	

Die erwartete Wirkung des dargestellten Produktes auf die Gerinnung bei intravenöser Injection blieb, wie aus dem Protokoll ersichtlich, vollkommen aus. Dass trotzdem in dem Präparat ein die Gerinnung beeinflussender Stoff vorhanden war, konnten wir dadurch beobachten, dass die geronnenen Blutproben sich rasch wieder verflüssigten, eine «Fibrinolyse» zeigten, die in einigen Fällen eine ganz ausserordentliche war. Eine ebensolche Fibrinolyse konnten wir auch nach der Injection von Pankreas- resp. Magenmucosa-Präparaten erkennen, nur dass sie hier mit einer direkten Peptozymwirkung combinirt war.

Endlich zeigt noch das Säureprodukt aus der Leber eine Wirkung auf die Gerinnung des aus der Ader gelassenen Blutes. Diese direkte, d. h. nicht von der Leber vermittelte Gerinnungshemmung, also eine echte Antithrombinwirkung, kann man jedoch mit Hülfe der Säureeinwirkung bei einer ganzen Reihe von Organen erzielen. Neben Leber, Pankreas und Magen wären auch hier z. B. Hoden und Thymus zu nennen, während wir beim Autolysat des Fibrins ein negatives Resultat erhielten. Auch für diese Gerinnungshemmung ist es charakteristisch, dass dieselbe nur bei schwach alkalischer Reaction erzielt werden kann, während eine Spur von saurer Reaction, ähnlich wie dies bei der Peptonwirkung gilt, die Gerinnungshemmung mehr oder weniger, aber immer sehr deutlich beeinträchtigt.

Die Antithrombinwirkung der übrigen von uns untersuchten Präparate gebe ich der Kürze wegen in Form einer Tabelle.

In allen Fällen wurde zu der, wo nichts Näheres bemerkt ist, schwach alkalischen Lösung des Präparates eine mehrfache Menge aus der Carotis entnommenen Blutes gefügt und die Gerinnungszeit verzeichnet.

Nr. des Versuchs	Präparat	Menge der Lösung	Menge des zugefügten Blutes	Tierart von der das Blut entnommen wurde	Gerinnt nach	Fibrinolyse
37	Säureprodukt der Leber, 5%ige Lösung . . . . .	1	5	Hund	118 Minuten	
38	Säureprodukt der Leber, 5%ige Lösung . . . . .	1	5	Lama	mehreren Stunden	
39	Säureprodukt aus Pankreas, 5%ige Lösung . . . . .	1	5	Hund	2 Tagen	
40	Autolysirtes Fibrin, doch neutral . . . . .	1	6	"	9 Minuten	
	Autolysirtes Fibrin, doch alkalisch . . . . .	1	6	"	8 1/2 Stunden	
41	Säureprodukt aus Magencmucosa, 5%ige Lösung, a) sauer . . . . .	1	6	"	6 Minuten	
	b) schwach alkalisch . . . . .	1	6	"	Tagen	
42	Säureprodukt aus Thymus, 5%ige Lösung, a) schwach sauer . . . . .	2	8	"	12 Minuten	} fehlt.
	b) alkalisch . . . . .	2	8	"	32 Minuten	
43	Säureprodukt aus Stierhoden, 5%ige Lösung, a) schwach sauer . . . . .	1	8	"	85 Minuten	fehlt.
	b) schwach alkalisch . . . . .	2	8	"	mehreren Stunden	fehlt.
44	Nebennieren, 1) sauer . . . . .	1	5	"	über 10 Stunden	
	alkalisch . . . . .	1	5	"	über 10 Stunden	
45	Milz, 1) schwach alkalisch . . . . .	2	7	"	über 10 Stunden	
46	Submaxillaris, 2) alkalisch . . . . .	2	2	"		
	schwach alkalisch . . . . .	2	8—10	"		
47	Lymphdrüsen, 2) alkalisch . . . . .	2	8—10	"	bis zur beginnenden Fäulnis ungeronnen	
48	Dickdarmmucosa, 2) sauer . . . . .	2	8—10	"	5 Minuten	
49	Dünndarmmucosa, 2) schwach alkalisch . . . . .	2	8—10	"	mehreren Tagen	
50	Oesophagusmucosa, 1) schwach alkalisch . . . . .	2	8—10	"	10 Stunden	

1) Säureprodukt in 5%iger Lösung.

2) Säureprodukt in 10%iger Lösung.



hemmung ist zum Theil eine einfache Deutung möglich.

Durch Arthus und Pagès<sup>1)</sup> ist bekanntlich die Nothwendigkeit der Kalksalze für die Gerinnung des Blutes und des Plasmas sicher bewiesen worden. Nun vermögen, wie erst kürzlich auch für einen Bestandtheil des normalen Serums und der Milch gezeigt worden ist,<sup>2)</sup> auch in den Körpersäften enthaltene Eiweissstoffe Kalk-Ionen in der Art zu binden, dass dieselben mit bestimmten Säuren nicht mehr oder nur unvollständig reagiren. Auch die von uns benützten Verdauungsflüssigkeiten zeigen ein theilweise gleiches Verhalten, in der Art, dass sie die Ausscheidung von phosphorsaurem und kohlensaurem Kalk bis zu einem gewissen Grade verzögern oder verhindern. Dass in der That die Kalkbindung den Grund für das Ausbleiben der Gerinnung bildet, gelang uns in jenen Fällen, wo darauf geachtet wurde, dadurch nachzuweisen, dass bei vorsichtigem Zusatz von Calciumacetat noch ein nachträgliches Eintreten der Gerinnung beobachtet werden konnte.

---

Allerdings gelten alle diese Angaben nur für das Blut des Hundes. Die wesentliche Differenz in Bezug auf die Gerinnbarkeit des Blutes, die zwischen Kaninchen und Hund bei den Albumosen beobachtet ist, können wir auch bei unseren Agentien zeigen. Wir haben unser albumosenreiches Pankreaspräparat und unser albumosen- und peptonfreies Leberpräparat Kaninchen injicirt und hier anstatt der beim Hunde beobachteten indirekten oder fibrinolytischen Wirkung nichts gesehen als Gerinnungsbeförderung. Beide Thiere gingen alsbald nach der Injection unter den charakteristischen und durch die Autopsie bestätigten Erscheinungen multipler Embolien zu Grunde.

#### Versuch LI.

Einem 2300 g schweren Kaninchen wurden 2,5 g der Pankreassäureprodukte in 20 ccm. alkalischer Lösung in die v. jugularis injicirt.

1) Archives de physiologie. Bd. 5. S. 739. 1890.

2) Spiro und Fuld, Diese Zeitschrift. Bd. XXXI. S. 132. 1900.

Blutentnahme aus der a. carotis		Zeitpunkt der Gerinnung Eprouvete	Capillare	
10 <sup>47</sup>	Normalprobe	10 <sup>53</sup>	10 <sup>53</sup>	
10 <sup>49</sup> —10 <sup>50</sup>	Injection			
10 <sup>53</sup>		11 <sup>01</sup>	11 <sup>03</sup>	} Ueberall rasche Contraction der Gerinnung unter reichlicher Serum- auspressung.
10 <sup>55</sup>		10 <sup>57</sup>	10 <sup>58</sup>	
10 <sup>57</sup>		11 <sup>01</sup>	11 <sup>03</sup>	

Exitus. Pupillen colossal verengt. Bei sofortiger Thoraxeröffnung finden sich allenthalben in den rechten Herzen und den grossen Venenstämmen, insbesondere der v. jugularis massenhafte Gerinnsel.

### Versuch LII.

#### Leber.

Einem 2750 g schweren Kaninchen wurde in die Jugularvene eine schwach alkalische Lösung von 3 g Säureprodukt aus Leber in 20 ccm. Wasser injicirt. Der Verlauf des Versuches war folgender:

Blutentnahme aus der a. carotis		Zeitpunkt der Gerinnung Eprouvete	Capillare
10 <sup>00</sup>	Normalprobe	10 <sup>10</sup>	10 <sup>03</sup>
10 <sup>02</sup> —10 <sup>04</sup>	Injection		
10 <sup>05</sup>		10 <sup>07</sup>	10 <sup>07</sup>
10 <sup>08</sup>		10 <sup>09</sup>	10 <sup>09</sup>
10 <sup>10</sup>	exitus.		

Das Thier geht zu Grunde unter Krämpfen und plötzlichem Athemstillstand. Die sofortige Eröffnung des Thorax zeigt grosse, feste Thromben im rechten Herzen und der art. pulmonalis.

Bezüglich der vielstudirten «Peptonimmunität», die wir jetzt an obige Nomenclatur anschliessend als Peptozymimmunität bezeichnen wollen, können wir endlich auch noch einige That-sachen beibringen. Fano hat zuerst gezeigt, dass Stoffe, die, wie die Tryptone, gar keine anticoagulirende Wirkung zeigen, diese Immunität auch hervorrufen können. Ellinger und der eine von uns fanden ein ähnliches Verhalten für eine Reihe von Stoffen. Durch die oben angegebenen Versuche wird dies in weitem Maasse bestätigt, denn fast alle von uns dargestellten Eiweisspräparate — eine interessante Ausnahme machen die durch Autolyse und ebenso die aus der Sub-maxillaris und aus Lymphdrüsen gewonnenen Produkte — haben, ohne dass sie anticoagulirend gewirkt haben, auch eine Immunität erzeugt; die Peptozymimmunität ist also unabhängig von der Peptozymwirkung.

Worauf diese (künstliche) Immunität beruht, darüber lassen sich einstweilen nur Vermuthungen aussprechen. Die Injection von Albumosen findet ihr Analogon in der gleichfalls eine gewisse Immunität hervorrufenden Eiweissverdauung; die im Magen erfolgende Bildung von Peptozym und dessen allmählicher Uebertritt in die Leber oder der in der Leber zunehmende Assimilationsvorgang kann zur Erklärung der fehlenden Antithrombinwirkung herangezogen werden.

Es erinnern diese Befunde, in denen Immunität gegen Peptozyme constatirt wurde, ohne dass der injicirte Stoff wie ein Peptozym gewirkt hatte, an die Befunde P. Ehrlich's und seiner Mitarbeiter, welche gewisse Modificationen der Toxine, die «Toxoide», kennen lehrten, die, ohne eine Giftwirkung auszuüben, doch eine Antitoxinbildung (resp. Immunität) hervorzurufen vermögen. — Als eine einfachere und länger bekannte analoge Erscheinung bei Körpern mit bekannter Constitution sei die relative Immunität angeführt, welche häufigerer Alkoholgenuss (Alkoholintoxication) gegen Aether, Chloroform und andere Stoffe der Alkoholgruppe hervorruft.

---

In einigen Fällen endlich sahen wir zufällig als Folge der Albumoseninjection ein merkwürdiges Verhalten: so zeigte ein Hund, der 5 Tage vorher Trypsinalbumosen intravenös erhalten hatte, ein eigenthümlich trübes Plasma, was um so mehr auffiel, als ja die injicirten Albumosen, wie seit Hofmeister oft bestätigt wurde, die Blutbahn schnell verlassen. Das Plasma, das (in Folge einer Wittepeptoninjection) nur äusserst langsam gerann, coagulirte sofort auf Zusatz von jenen Trypsinalbumosen, die die eigenthümliche Immunität hervorgerufen hatten. Diese Coagulation, deren Analogie mit den in jüngster Zeit beobachteten Coagulinphänomenen ohne Weiteres einleuchtet, war übrigens keine «specifische», da sie auch, wenn auch langsamer durch andere, mittelst Säure gewonnene Fibrinalbumosen, noch langsamer durch Wittepepton, oder Fibringlobulin oder eine Serumglobulinfraction (Euglobulin, nicht aber durch eine andere, die Pseudoglobulinfraction) hervorgerufen werden konnte.

Versuch LIII.

Einem 8 Kilo schweren Hunde, der einige Tage vorher Trypsinalbumosen erhalten hatte, wurden 4 g Wittepepton intravenös beigebracht.

Auf der Höhe der Peptonwirkung wurden diesem Hunde 50 ccm. arteriellen Blutes entnommen; das Blut blieb, wie die Kontrollproben zeigten, durch 24 Stunden ungerinnbar. Dasselbe wurde durch Centrifugiren von den rothen Blutkörperchen befreit und das trübe Plasma zu gleichen Theilen mit Lösungen nachfolgender Eiweisskörper versetzt:

	Gerinnungszeit	Bemerkung
Serumglobulinfraction I u. II	1 1/2 Stunden	Nach der Gerinnung tritt Lösung auf.
Serumglobulinfraction III . Säurespaltungsprodukte des Fibrins . . . . .	Bleibt ungeronnen  10 Minuten	Der gleiche Befund.
Wittepeptonlösung . . . .	1/2 Stunde	Bleibt geronnen.
Tryptosenlösung des Fibrins	Gerinnt sofort	Bleibt geronnen.
Plasma allein . . . . .	24 Stunden	Nach der Gerinnung tritt Lösung auf.

Dass diese auffallende, so lange anhaltende «Coagulinimmunität» mit der Peptozymimmunität nichts zu thun hat, geht am besten aus dem Versuche selber hervor. Denn dieser Hund, dessen Serum in Folge der Trypsinalbumoseninjection so trübe geworden war und mit Trypsinalbumosen unter Coagulation reagierte, war in Bezug auf sein Blut nicht «peptonimmun», sondern zeigte nach Injection von Wittepepton sofort ungerinnbares Blut, dessen Plasma weiter trüb blieb. Die beiden unabhängig von einander verlaufenden Immunisirungsvorgänge gehen offenbar auch örtlich getrennt vor sich, der Process der Bildung des Antithrombins in der Leber, jener des Coagulins im Blute selbst.

# **Die Injection von Tetanustoxin bezw. Antitoxin in den subarachnoidalen Raum.<sup>1)</sup>**

Von  
**Dr. F. Ransom.**

---

Aus der Abtheilung für experimentelle Therapie des Hygienischen Instituts  
der Universität Marburg.

(Der Redaction zugegangen am 30. October 1900.)

---

In zwei früheren Arbeiten<sup>2)</sup> habe ich über die Vertheilung des Tetanustoxins bezw. des Antitoxins im Thierkörper nach subcutaner und nach intravenöser Injection berichtet. Jetzt möchte ich weitere Versuche mittheilen, welche in analoger Weise die Ergebnisse nach Injection in den subarachnoidalen Raum mittelst Gehirnstich resp. Lumbalpunktion darstellen sollten. Der Bericht kann auch als ein Beitrag zur Frage der Behandlung von Tetanus mittelst subarachnoidaler Injection von Antitoxin betrachtet werden.

Methodik. Bei der intracerebralen Injection habe ich in bekannter Weise<sup>3)</sup> mit einem feinen Bohrer ein Loch ins Schädeldach etwas rechts oder links von der Mittellinie gemacht, dann die Nadel der Spritze ungefähr 0,5 cm. bei

---

1) Vorläufig mitgetheilt in den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Förderung der gesammten Naturwissenschaften in Marburg, Juni 1900.

2) Diese Zeitschrift Heft 4/5 und Heft 6 Bd. XXIX.

3) Roux et Borrel, Ann. Pasteur 1898, avril.

Meerschweinchen (bei grösseren Thieren entsprechend tiefer) eingestochen und 0,2 ccm. Flüssigkeit injicirt.

Die Lumbalpunktion wurde mit einer schräg abgeschliffenen Kanüle ausgeführt<sup>1)</sup> — bei entsprechend kleinen Kanülen machte die Operation auch bei Meerschweinchen und jungen Kaninchen keine Schwierigkeiten.

Die Injection mittelst Lumbalpunktion ist bekanntlich<sup>2)</sup> als eine subarachnoidale anzusehen und dasselbe gilt, wie ich mich bei Meerschweinchen und Kaninchen überzeugt habe, für die sogenannte intracerebrale Einspritzung.

Färbt man z. B. die Injectionsflüssigkeit mit Lithionkarmin und spritzt rechts oder links durch den Schädel in das Cerebrum ein, so findet man nach wenigen Minuten den Farbstoff schon bis zur cauda equina hingedrungen.

Zunächst wollte ich ermitteln, ob das in den subarachnoidalen Raum eingebrachte Toxin oder Antitoxin daraus entweiche oder aber, ob es vielleicht in die Nervensubstanz eindringe und dort zurückbehalten werde. Zu diesem Zweck spritzte ich je nachdem mittelst Gehirnstich oder Lumbalpunktion ein und prüfte dann nach so und so viel Minuten oder Stunden das Blut und das auspräparirte Gehirn und Rückenmark auf Toxin resp. Antitoxin. Bei dem Auspräpariren wurde die Cerebrospinalflüssigkeit entfernt oder weglaufen gelassen. Für die Prüfungen wurde Cerebrum mit Cerebellum und Rückenmark mit Medulla oblongata einzeln verarbeitet. In den meisten Fällen bei kleinen Thieren wurde das Gehirn (grosses und kleines) von vorne nach hinten in zwei Hälften getheilt und die rechte mit der linken Seite verglichen. Das abgewogene Organ wurde mit dem zweifachen Gewicht 0,85%iger Kochsalzlösung zu einer möglichst feinen Emulsion verrieben; von dieser Emulsion wurde den Mäusen, welche dem physiologischen Nachweis des Giftes dienten, 0,3 bis 0,5 ccm. subcutan eingespritzt. Bei der Prüfung auf Antitoxin wurde die

---

<sup>1)</sup> Quincke, Berlin. Klin. Wochenschrift 1895, Nr. 41.

<sup>2)</sup> Key und Retzius, Studien in der Anatomie des Nervensystems. Stockholm 1875—1876.

**Abkürzungen.** Die Berechnung des Gift- bzw. Antitoxinwerthes erfolgt in + Ms. und — Ms. 1 Ms. bedeutet 1 g Lebendmausgewicht. 1 + Ms. ist die Giftmenge, welche 1 Ms. nach 3 bis 4 Tagen an Tetanus tötet; danach töteten z. B. 10 + Ms. eine Maus von 10 g nach 3 bis 4 Tagen, oder eine Flüssigkeit, wovon 0,5 ccm. eine Maus von 15 g nach 3 bis 4 Tagen an Tetanus tötet, enthält in 1 ccm. 30 + Ms. 1 — Ms. ist die Antitoxinmenge, welche 1 + Ms. eines Pestgiftes unter bestimmten Umständen unschädlich macht.

- keine Symptome.
- leichter localer Tetanus.
- = schwerer „ „
- ≡ ausgebreiteter Tetanus.
- † Tod an Tetanus.

### **Intracerebrale Injection von Tetanustoxin bei Meerschweinchen.**

M. Nr. 813; 310 g	12. Mai 1900.	Nach 3 Std.
0,2 ccm.	Tet.-G. Nr. 5, 14. IV. 1000	† an cerebralem
	10	Tetanus.
	Mit Lithionkarmin gefärbt	
	intracerebral links.	
	= 120 000 + Ms.	
	= 400 + Ms. pro 1 g	
	Sectionsbefund: Der Farbstoff	
	reicht bis zur Cauda equina.	

M. Nr. 838; 250 g	14. Mai 1900.	Nach 5½ Std.
0,2 ccm.	Tet.-G. Nr. 5, 4. IV. 1900	† an cerebralem
	10	Tetanus.
	Mit Lithionkarmin gefärbt	
	intracerebral links.	
	= 120 000 + Ms.	
	= 480 + Ms. pro 1 g	
	Sectionsbefund: Der Farbstoff	
	bis zur Cauda equina erkennbar.	

Protokoll 3.

M. Nr. 873; 245 g	30. Mai 1900.	Nach $4\frac{1}{2}$ Std.
0,2 ccm.	Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900	† an cerebralem Tetanus.
	10	
	Mit Lithionkarmin gefärbt	
	intracerebral links.	
	= 120 000 + Ms.	
	= 490 + Ms. pro 1 g	
	Sectionsbefund: Der Farbstoff	
	bis zur Cauda equina erkennbar.	

Die Section wurde jedesmal gleich nach dem Tode gemacht und dabei das Blut zur Prüfung aus dem Herzen entnommen. Die Ergebnisse der Prüfungen sind in der Tafel 1 dargestellt.

Tafel 1.

Thier Nr.	Blutserum		Gr. u. kl. Hirn		R.-Mark mit Med. obl.	
	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. Emulsion enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. Emulsion enthält	Verlauf
813	35 + Ms.	† 36 St.	46 + Ms.	=	40 + Ms.	† $5\frac{1}{2}$ Tage
838	52 + Ms.	† 2 Tage	rechts 30 + Ms. links 31 + Ms.	=	29 + Ms.	† 10 Tage
873	50 + Ms.	† $3\frac{1}{2}$ Tage	45 + Ms.	=	45 + Ms.	† $9\frac{1}{2}$ Tage

Augenscheinlich langte das Tetanusgift nach intracerebraler Injection schnell in der Blutbahn an. Die Meer-schweinchen sind 3 resp.  $4\frac{1}{2}$  und 5 Stunden nach der Injection an typischem cerebralen Tetanus gestorben und das aus den Herzen entnommene Blut enthielt jedesmal eine so beträchtliche Menge Gift, dass die damit eingespritzten Mäuse alle an Tetanus gestorben sind.

Andererseits liess sich ziemlich viel Gift im Gehirn und im Rückenmark nachweisen, jedenfalls mehr als allein aus dem Blutgehalt dieser Organe zu erklären wäre. So z. B. bei M. Nr. 873 waren in 1 ccm. Blutserum ca. 50 + Ms. und in 1 ccm. Rückenmarkemulsion ca. 25 + Ms., die



Organsubstanz macht aber nur  $\frac{1}{3}$  der Emulsion aus und das darin enthaltene Serum natürlich noch weniger. Demnach enthielt das Centralnervensystem, etwa 5 Stunden nach der intracerebralen Injection, mehr Gift, als auf dessen Blutgehalt zurückzuführen wäre. Dieses Plus an Gift kann nicht der Cerebrospinalflüssigkeit zugeschrieben werden, denn dieselbe geht während des Auspräparirens bei solchen kleinen Thieren verloren.

Weiter beachtenswerth ist das Verschwinden einer grösseren Portion Gift in der Zeit zwischen dem Einpritzen und dem Tode. Injicirt wurde bei M. Nr. 873 ca. 490 + Ms. pro 1 g Körpergewicht, wiedergefunden ca. 50 + Ms. in 1 ccm. Serum und ca. 75 + Ms. in 1 g Nervensubstanz. Einen ähnlichen Verlust an Gift nach intravenöser bzw. subcutaner Injection sah zuerst Knorr.<sup>1)</sup> Dass viel Gift in der Cerebrospinalflüssigkeit zurückgeblieben war, wird durch den Versuch an Hund Nr. 20 unwahrscheinlich gemacht.

Aus den Ergebnissen der Prüfungen des Blutes geht deutlich hervor, dass das Tetanusgift aus dem subarachnoidalen Raum zum Theil in die Blutbahn übergeht.

Die Prüfungen des Centralnervensystems, in Zusammenhang mit den unten mitgetheilten Beobachtungen, deuten vielleicht auf eine sich allmählich vollziehende Verbindung zwischen der Nervensubstanz und dem Gift und wären demnach in Einklang mit meinen früheren Beobachtungen an Tauben.<sup>2)</sup>

In dieser Beziehung ist folgende Versuchsreihe von Interesse. Ich injicirte 4 Meerschweinchen subcutan, jedem etwa die zehnfache tödtliche Minimaldosis und untersuchte Blut und Centralnervensystem auf Gift, bei Nr. 1 20 Stunden, bei Nr. 2 24 Stunden, bei Nr. 3 34 Stunden nach der Injection. Das Gift war in jedem Falle im Blut, aber nicht im Centralnervensystem nachweisbar. Demnach war es nach subcutaner Injection nicht gelungen, das Gift im Gehirn oder im Rückenmark nachzuweisen, wohl aber nach intracerebraler Einspritzung.

---

1) A. Knorr, Habilitationsschrift. Marburg 1894, S. 24.

2) Behring und Ransom, Deutsch. med. Wochenschrift 1898 Nr. 12.

Versuch II.  
Intracerebrale Injection von Tetanusgift bei Kaninchen.

Protokoll 4.

K. Nr. 1; 1010 g	5. Juli 1900.	5 Min. nach der
	Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900	Injection schwere
	0,2 ccm. $\frac{2,5}{2,5}$	Krämpfe.
	intracerebral	† nach 9 Stunden.
	= 480 000 + Ms.	
	= 480 + Ms. pro 1 g.	
	Nach 6 Stunden Blutentnahme,	
	» 9 » vom	
	totden Hund.	

Protokoll 5.

K. Nr. 2; 1000 g	5. Juli 1900.	6. Juli 1900.
	Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900	2 Uhr Nachm.
	0,2 ccm. $\frac{15}{15}$	schwere Krämpfe,
	intracerebral	7 Uhr Abends †.
	= 80 000 + Ms.	
	= 80 + Ms. pro 1 g.	
	Nach 6 Stunden Blutentnahme	
	» 9 $\frac{1}{2}$ » »	
	» 24 » »	

Protokoll 6.

K. Nr. 3; 1150 g	13. Juli 1900.	Bald nach der
	Tet.-G. Nr. 5, 6, VII. 1900	Injection schwere
	intracerebral	Krämpfe. † nach
	= 1 200 000 + Ms.	7 $\frac{1}{2}$ Stunden.
	= ca. 1000 + Ms. pro 1 g	
	Nach $\frac{1}{2}$ Stunde Blutentnahme	
	» 2 Stunden »	
	» 5 » »	

Protokoll 7.

K. Nr. 148; 1550 g	30. Mai 1900.	Bis zum Tode
	Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900.	keine Symptome.
	0,2 ccm. $\frac{10}{10}$	
	intracerebral links	
	= 120 000 + Ms.	
	= ca. 76 + Ms. pro 1 g.	
	Nach 6 Stunden mit Chloroform ge-	
	tötet, Gehirn und Rückenmark aus-	
	präpariert und Blut aus dem Herzen	
	entnommen.	

Die Ergebnisse der Prüfungen sind in Tafeln 2 und 3 wiedergegeben.

Tafel 2.

Thier-Nr. und Giftdosis pro 1 g Körper- gewicht	Blutserum	
	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
K. Nr. 2	Nach 6 Stunden 28 + Ms.	○
80 + Ms.	» 9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> » 28 + Ms.	○
	» 24 » 30 + Ms.	○
K. Nr. 1	» 6 » 30 + Ms.	=
480 + Ms.	» 9 » 32 + Ms.	—
	» 1 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Stunde 38 + Ms.	=
K. Nr. 3	» 2 Stunden 37 + Ms.	=
1000 + Ms.	» 5 » 31 + Ms.	† 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage

Tafel 3.

Thier Nr. und Gift- dosis	Blutserum		Grosses u. kleines Hirn		R.-Mark mit Med. obl.	
	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. Emul- sion enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. Emul- sion enthält	Verlauf
K. 148	42 + Ms.	○	rechts 23 + Ms.	=	39 + Ms.	† 5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage
76 + Ms. pro 1 g	24 + Ms.	○	links 26 + Ms.	+ 8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage		

Diese Resultate sind in voller Uebereinstimmung mit den Ergebnissen der Versuche an Meerschweinchen, indem nach intracerebraler Injection von grösseren Dosen bei Kaninchen das Gift schnell in der Blutbahn erscheint. War aber die Giftdosis eine kleinere etwa die Hälfte der tödtlichen Minimaldosis, wie bei K. Nr. 2 und K. Nr. 148, so konnte ich nach 6 Stunden kein Gift im Blute nachweisen, fand es aber bei K. Nr. 148 deutlich noch im Centralnervensystem. Nach einer grösseren Giftdosis — etwa

der sechsfachen tödtlichen Minimaldosis bei K. Nr. 3 — war der Giftgehalt des Blutes von  $\frac{1}{2}$  Stunde bis 5 Stunden nach der Injection im Steigen begriffen. Bei K. Nr. 1 dagegen, welches circa die dreifache tödtliche Minimaldosis erhalten hatte, hatte der Giftwerth des Blutes schon in 6 Stunden das Maximum erreicht und war nach 9 Stunden wieder gesunken. In keinem Falle jedoch war das ganze injicirte Gift in die Blutbahn übergegangen, denn obschon, wie Behring<sup>1)</sup> gezeigt hat, die direkte Prüfung des Kaninchenblutes an Mäusen zu niedrige Werthe ergibt, so fehlt immerhin noch eine beträchtliche Menge Gift. Ein kleinerer Theil des fehlenden Toxins befand sich (K. Nr. 148) im Centralnervensystem und etwas war wohl, wie im nächsten Versuch an Hund Nr. 20, in der Cerebrospinalflüssigkeit zurückgeblieben, damit wäre aber das Deficit nicht gedeckt. Betrachten wir diese Thatsachen im Zusammenhang mit dem Befund bei K. Nr. 148, welches 6 Stunden nach der Injection Gift im Centralnervensystem, aber nicht im Blute hatte, so scheint die Vermuthung nicht ungerechtfertigt, dass das verschwundene Gift, wenigstens zum Theil, vom Centralnervensystem in Anspruch genommen worden war.

### Versuch III.

#### Intracerebrale Injection von Tetanusgift bei einem Hunde.

##### Protokoll 8.

Hund Nr. 20, 4700 g	15. Juni 1900.	16 Juni Getödtet.
	0,5 ccm. Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900.	
	100	
	intracerebral	
	= 30 000 + Ms.	
	= 7 + Ms. pro 1 g.	
	Nach 6 Stunden Blutprobe aus der art. fem. und Lymphe aus dem ductus thorac. entnommen. Cere- brospinalflüssigkeit mittelst Lum- balpunction gewonnen.	

<sup>1)</sup> Behring, Allgem. Therapie d. Infectiouskrankheiten, S. 1083, Wien 1900.

Blutserum		Halslymphe		Cerebrospinalflüssigkeit	
Geprüft auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Geprüft auf 1 ccm enthält	Verlauf	Geprüft auf 1 ccm. enthält	Verlauf
31 + Ms.	=	30 + Ms.	—	31 + Ms. 500 + Ms. 5000 + Ms.	+ 36 Stunden + 6 1/2 Tage —

Demnach war nach 6 Stunden ein Theil des intracerebral eingespritzten Giftes in das Blut und die Lymphe übergegangen, ein anderer Theil befand sich noch im subarachnoidalen Raum, die Hauptmenge aber war verschwunden. Wir können die Berechnung folgendermaassen anstellen :

Injicirt im Ganzen 30 000 + Ms.

Wiedergefunden:  $\left\{ \begin{array}{l} \text{in 1 ccm. Blutserum ca. 15 + Ms.} \\ \text{> 1 > Lymphe ca. 5 + Ms.} \\ \text{> 1 > Cerebrospinalflüssigkeit ca. 400 + Ms.} \end{array} \right.$

Nehmen wir ferner an :

Blutserum = ca.  $\frac{1}{18}$  des Körpergewichts,

Lymphe = „  $\frac{1}{12}$  „ „

Cerebrospinalflüssigkeit = 10 ccm.,

so haben wir

im Blute und in der Lymphe zusammen 7000 + Ms.

in 10 ccm. Cerebrospinalflüssigkeit 4000 + Ms.

11 000 + Ms.

nachweisen können — 19000 + Ms. sind verloren gegangen. Zwar wird dieser Verlust, wie Behring<sup>1)</sup> für Kaninchen gezeigt hat, nicht so gross sein, als er beim ersten Blick erscheint, aber ein beträchtlicher Verlust ist jedenfalls zu constatiren.

Wenn nun ein Theil des Giftes weder in das Blut noch in die Lymphe übergegangen und doch aus der Cerebrospinal-

<sup>1)</sup> l. c. S. 1084.

flüssigkeit verschwunden war, so liegt die Vermuthung nahe, dass das fehlende Toxin im Centralnervensystem gebunden wurde.

Diese Versuche an Meerschweinchen, Kaninchen und einem Hunde beweisen in erster Linie, dass das Tetanustoxin nach intracerebraler Injection zum Theil in die Blutbahn übergeht. In zweiter Linie unterstützen sie die schon ziemlich allgemein acceptirte Ansicht,<sup>1)</sup> dass das Tetanustoxin im Centralnervensystem gebunden wird. Ferner deuten die Ergebnisse bei den Meerschweinchen und Kaninchen darauf hin, dass dieses Fixiren des Giftes nicht schnell vollendet, sondern nur allmählich zu Stande gebracht wird.

Wir wenden uns jetzt zu der Betrachtung der Ergebnisse nach intracerebraler Injection von Antitoxin. Die Versuche sind nur an Meerschweinchen ausgeführt.

#### Versuch IV.

##### **Intracerebrale Injection von Tetanusantitoxin.**

Zunächst führe ich einige Versuche vor, welche als Kontrolle dienen, indem sie die giftneutralisirende Kraft des Meerschweinchen-Nervensystems unter anderen Bedingungen als nach intracerebraler Injection des Antitoxins darstellen. Diese sind die ersten drei Thiere in Tafel 5, nämlich:

M. Nr. 835. Gehirn und Rückenmark eines frischen unbehandelten Meerschweinchens.

M. Nr. 837. Gehirn und Rückenmark eines Meerschweinchens, welches 48 Stunden vorher eine kleinere Antitoxindosis subcutan erhalten hatte.

M. Nr. 762. Gehirn und Rückenmark eines Meerschweinchens, welches 23 Stunden vorher eine grössere Antitoxindosis subcutan erhalten hatte.

Es folgen dann in der Tafel fünf Thiere, welche vor der Untersuchung des Centralnervensystems auf Antitoxin eine Antitoxindosis intracerebral erhalten hatten.

---

<sup>1)</sup> Ehrlich, Die Werthbemessung des Diphtherieheilserums. Klin. Jahrbuch Bd. VI. 1897.

Tafel 5.

Pier Nr.	Antikozin pro 1 g Körper- gewicht	Wie gegeben	Geldloht nach	Blutserum		Gehirn (gross und klein)		R-Mark mit Med. obl.	
				Geprüft auf 1 cem. enthält	Verlauf	Geprüft auf 1 cem. Emission enthält	Verlauf	Geprüft auf 1 cem. Emission enthält	Verlauf
885	0	—	—	—	—	links 1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 31 $\frac{1}{2}$ Tage	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 31 $\frac{1}{2}$ Tage + 21 $\frac{1}{2}$ Tage
887	88 000 — Ms.	subcutan	48 St.	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	0	rechts 1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 31 $\frac{1}{2}$ Tage	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 61 $\frac{1}{2}$ Tage + 21 $\frac{1}{2}$ Tage
788	4 000 000 — Ms.	subcutan	28 St.	2,8 Mill. — Ms. 28 Mill. — Ms.	0 + 24 St.	links 100 000 — Ms. 600 000 — Ms. 100 000 — Ms. 600 000 — Ms.	+ 31 $\frac{1}{2}$ Tage + 36 St. + 2 Tage + 36 St.	100 000 — Ms. 600 000 — Ms. 100 000 — Ms. 600 000 — Ms.	+ 36 St. + 16 St.
788	29 500 — Ms.	Intracerebral links	24 St.	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	0	rechts 1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 31 $\frac{1}{2}$ Tage	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 81 $\frac{1}{2}$ Tage + 31 $\frac{1}{2}$ Tage
884	29 600 — Ms.	Intracerebral links	48 St.	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 36 St.	rechts 1 000 — Ms. 10 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 31 $\frac{1}{2}$ Tage + 31 $\frac{1}{2}$ Tage	1 000 — Ms. 10 000 — Ms. 10 000 — Ms.	+ 5 Tage + 21 $\frac{1}{2}$ Tage
882	27 000 — Ms.	Intracerebral links	4 X 24 St.	800 — Ms. 8 000 — Ms.	+ 51 $\frac{1}{2}$ Tage + 21 $\frac{1}{2}$ Tage	800 — Ms. 8 000 — Ms.	0 + 31 $\frac{1}{2}$ Tage	800 — Ms. 8 000 — Ms.	+ 3 Tage + 36 St.
846	285 000 — Ms.	Intracerebral links	17 St.	1 000 — Ms. 10 000 — Ms. 50 000 — Ms.	0 0 0	rechts 1 000 — Ms. 10 000 — Ms. 1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	0 — 0	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	0 =
889	338 333 — Ms.	Intracerebral links	28 St.	5 000 — Ms. 50 000 — Ms.	0 0	rechts 1 000 — Ms. 10 000 — Ms. 1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	0 — 0 0	1 000 — Ms. 10 000 — Ms.	0 + 71 $\frac{1}{2}$ Tage

Aus dem Protokoll für M. Nr. 835 ersehen wir, dass 1 ccm. der Emulsion (= 0,33 g Nervensubstanz) des Gehirns von dem unbehandelten Meerschweinchen beinahe 1000 + Ms. meines Giftes neutralisirte und ferner, dass die entgiftende Kraft des Rückenmarks beträchtlich kleiner war als die des Gehirns.<sup>1)</sup> Diese Thatsache, dass das Gift ausserhalb des Thierkörpers weniger stark vom Rückenmark als vom Gehirn neutralisirt wird, gewinnt an Wichtigkeit, wenn wir sie neben den Versuchen I und II betrachten, welche ergeben hatten, dass das Rückenmark nach intracerebraler Injection mehr Gift enthält als dasselbe Gewicht Gehirn. Wenn der letzte Befund nicht auf Zufall beruht — eine Annahme, welche bei der Gleichmässigkeit der Versuchsergebnisse kaum zulässig ist —, so darf man ihn gelegentlich einer Besprechung der Wirkungsweise des Tetanustoxins nicht ausser Acht lassen. Es wird im Allgemeinen angenommen, dass sich der Hauptangriffspunkt des Giftes im Rückenmark befinde, man sollte aber die Erscheinungen nicht vergessen, welche auf eine weitere Ausdehnung der Giftempfindlichkeit hindeuten. Kaninchen zeigen nämlich nach grösseren Dosen eigenthümliche allgemeine Lähmungserscheinungen, welche sogar den Tod bewirken können. — Warme Frösche, speciel *R. temporaria*, fallen oft, nach subcutaner oder intravenöser Injection von hohen Dosen des Giftes, in einen curarisirten Zustand, welcher tagelang anhält. — Hühner bekommen vor dem Einsetzen des Starrkrampfes merkwürdige Symptome, welche auf eine mehr ausgedehnte Wirkung des Giftes schliessen lassen. Wenn also die Erregung der Reflexe und der Starrkrampf die deutlichsten Merkmale des Tetanus sind, so schliesst dies nicht aus, dass das Gift auch andere weniger in die Augen fallende Wirkungen haben kann.

Um nun zur Tafel 5 zurückzukehren. Ein Vergleich zwischen M. Nr. 835 und M. Nr. 837 lehrt uns, dass nach subcutaner Injection von Antitoxin in mittleren Dosen die giftneutralisirende Kraft des Centralnervensystems nicht erhöht wird.

<sup>1)</sup> Wie auch Wassermann gezeigt hat, Berlin. klin. Wochenschrift. 1898. Nr. 1.



nervensystem enthaltene kleinere Menge Antitoxin auf das mit eingeschlossene Blut zurückzuführen.

Die Tafel beweist zur Genüge, dass das Antitoxin nach intracerebraler Injection zum grössten Theil schnell in die Blutbahn übergeht.<sup>1)</sup>

Eine Erhöhung der normalen entgiftenden Kraft des Centralnervensystems nach intracerebraler Injection von ziemlich grossen Antitoxinmengen (M. Nr. 788, Nr. 834 und Nr. 849) konnte nicht nachgewiesen werden, und wenn nach sehr grossen Antitoxindosen (M. Nr. 845 und Nr. 829) eine scheinbare Zunahme stattfand, so war dies auch der Fall nach subcutaner Verabreichung (M. Nr. 762) ähnlicher Dosen.

Wir haben also einen auffallenden und interessanten Gegensatz zwischen Toxin und Antitoxin gefunden. — Das Toxin nach intracerebraler Injection geht nur zum Theil in die Blutbahn über, eine beträchtliche Menge bleibt im Centralnervensystem hängen und kann eine Zeit lang da nachgewiesen werden, aber ein grosser Theil des eingespritzten Giftes entzieht sich jedem Nachweis.

Das Antitoxin dagegen tritt fast vollständig aus dem subarachnoidalen Raum in die Blutbahn über, und zwar so, dass etwa 24 Stunden nach der Injection annähernd das ganze eingespritzte Antitoxin sich im Blutserum befindet.

Das Verhalten des Giftes unterstützt kräftig die Vermuthung, dass das Tetanustoxin im lebenden Thier vom Centralnervensystem gebunden wird. Andererseits ist der schnelle Uebergang des Antitoxins aus dem subarachnoidalen Raum in das Blut eine Thatsache, welche bei der Betrachtung der Frage von der Behandlung des Tetanus mittelst Injection des Antitoxins in die Cerebrospinalflüssigkeit nicht ausser Acht gelassen werden kann.

---

Obschon, wie ich oben gesagt habe, die Injection durch Gehirnstich und diejenige mittelst Lumbalpunktion insofern

---

1) Auch Blumenthal fand Antitoxin im Blute nach intracerebraler Injection. Der Tetanus, v. Leyden und Blumenthal. Wien 1900.

als gleichbedeutend zu betrachten sind, als die eingespritzte Flüssigkeit in beiden Fällen in den subarachnoidalen Raum kommt, scheint es mir doch zweckmässig, über die Verabreichung von Gift bezw. Antitoxin mittelst Lumbalpunktion einzeln zu berichten.

Versuch V.

Injection von Tetanugift mittelst Lumbalpunktion bei einem Hunde.

Hund Nr. 24 erhielt 850 + Ms. pro 1 g Körpergewicht mittelst Lumbalpunktion injicirt. Das Blut wurde 24 Stunden und 48 Stunden nach der Injection auf Giftgehalt geprüft. Die Ergebnisse der Prüfungen sind in Tafel 6 dargestellt.

Tafel 6.

Blutserum Hund Nr. 24.

Zeit der Entnahme	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
24 Stunden	500 + Ms.	† 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage
	2000 + Ms.	† 3 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage
48 Stunden	100 + Ms.	† 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage
	500 + Ms.	† 5 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage

Versuch VI.

Injection von Tetanusantitoxin mittelst Lumbalpunktion bei einem Hunde.

Hund Nr. 20 erhielt 100000 — Ms. pro 1 g Körpergewicht mittelst Lumbalpunktion injicirt.

Tafel 7.

Blutserum Hund Nr. 20

Zeit der Entnahme	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
7 Stunden	500000 — Ms.	○
	800000 — Ms.	† 2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage
	1000000 — Ms.	† 36 Stunden
24 Stunden	500000 — Ms.	○
	800000 — Ms.	○
	1000000 — Ms.	† 7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> Tage

Das Blut wurde 7 Stunden und 24 Stunden nach der Injection auf Antitoxingehalt geprüft. Die Ergebnisse der Prüfungen sind in Tafel 7 dargestellt.

Es ergibt sich ohne Weiteres aus den zwei Tafeln, dass nach Injection mittelst Lumbalpunktion sowohl das Tetanustoxin wie das Antitoxin in bedeutender Menge und mit beträchtlicher Schnelligkeit, in der Blutbahn erscheint. Was die Menge betrifft, so war thatsächlich nach 24 Stunden fast das ganze injicirte Antitoxin in die Blutbahn übergegangen. Wir dürfen also voraussetzen, dass etwaiges im Blute kreisendes Gift durch Injection von Antitoxin mittelst Gehirnstich oder Lumbalpunktion in ähnlicher Weise neutralisirt sein würde, als nach subcutaner oder intravenöser Verabreichung.

Da nun die oben mitgetheilten Versuche gezeigt hatten, dass das Tetanustoxin bezw. das Antitoxin aus dem subarachnoidalen Raum austritt, so schien es mir interessant, zu ermitteln, ob eine Bewegung in der umgekehrten Richtung stattfinden kann. Zu diesem Zweck untersuchte ich die Cerebrospinalflüssigkeit nach intravenöser und nach subcutaner Injection von Tetanustoxin bezw. Antitoxin.

#### Versuch VII.

Intravenöse Injection von Tetanustoxin. Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit.

##### Protokoll 8.

Hund Nr. 23 5800 g	18. VI. 1900, 9 Uhr Morgens	19./VI. Morgens ○
	0,6 ccm. Tet.-G. Nr. 5.	Abends ≡
	14. V. 1900.	20./VI. † gefunden
	intravenös	
	= 3600 000 + Ms.	
	= ca. 500 + Ms. pro 1 g	
	Nach 6 Stunden Lumbalpunktion	
	„ 24 „ „	
	und Blutentnahme.	

Die Ergebnisse der Prüfungen des Blutes und der Cerebrospinalflüssigkeit sind in Tafel 8 zusammengestellt.

Tafel 8.

Cerebrospinalflüssigkeit			Blutserum		
Zeit der Entnahme	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Zeit der Entnahme	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
6 St. {	30 + Ms.	Spur ?	24 St. {	90 + Ms.	† 36 St.
	30 + Ms.	○		200 + Ms.	† 2 1/2 Tage
24 St. {	39 + Ms.	○		400 + Ms.	† 4 Tage
	35 + Ms.	Spur ?			

In die Cerebrospinalflüssigkeit war bei der Entnahme eine Spur Blut hineingerathen. Die zwei Mäuse, welche bei der Prüfung der Cerebrospinalflüssigkeit einen kaum wahrnehmbaren Anflug von Tetanus zeigten, können wohl denselben von dem beigemischten Blut bekommen haben.

Es ergibt sich unzweideutig aus der Tafel, dass das Tetanusgift nur in verschwindend kleinen Mengen, wenn überhaupt, aus dem Blute in die Cerebrospinalflüssigkeit übertritt.<sup>1)</sup> (Wie ich früher gezeigt habe, besitzt die Cerebrospinalflüssigkeit keine oder nur eine minimale Fähigkeit, das Tetanusgift zu neutralisiren.)

Nach diesem Befund wird es sich wohl kaum lohnen, in der Cerebrospinalflüssigkeit von tetanuskranken Menschen nach Tetanusgift zu suchen. Wir können nicht annehmen, dass das Gift den Weg durch die Cerebrospinalflüssigkeit (d. h. die im subarachnoidalen Raum befindliche Flüssigkeit) nimmt, um an die Zellen des Centralnervensystems zu gelangen. Von der grossen, etwa 6000 + Ms. in 1 ccm. betragenden Giftmenge, welche in das Blut eingespritzt wurde, war nach 24 Stunden nur noch der 15. Theil im Blute nachweisbar; obschon indessen so viel Gift aus der Blutbahn verschwunden war, konnte ich in der Cerebrospinalflüssigkeit kaum eine Spur davon finden.

<sup>1)</sup> Stintzing R., Grenzgebiete d. Med. u. Chir. Bd. III, Heft 3/4, 1898, hat einmal Gift in der Cerebrospinalflüssigkeit gefunden.

Blumenthal und Jacob, Berlin, klin. Wochenschrift 1898 Nr. 49 haben das Gift bei Ziegen nicht gefunden.

Versuch VIII.

Intravenöse bzw. subcutane Injection von Tetanusantitoxin.  
Untersuchung der Cerebrospinalflüssigkeit.

Hund Nr. 19 erhielt 90000 — Ms. pro 1 g Körpergewicht intravenös.

Geprüft auf Antitoxingehalt wurden Blut, Halslymphe und Cerebrospinalflüssigkeit. Die Ergebnisse stehen in Tafel 9.

Tafel 9.

Zeit nach der Injection.	Cerebrospinalflüssigkeit		Blutserum		Halslymphe	
	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
7 St.	75 000—Ms.	+ 46 St.	400 000—Ms.	○	200 000—Ms.	○
	200 000—Ms.	+ 33 St.	600 000—Ms.	○	400 000—Ms.	○
78 St.	1 000—Ms.	+ 2 1/2 Tage	10 000—Ms.	○		
	10 000—Ms.	+ 24 St.	100 000—Ms.	○		
9×24 St.	1 000—Ms.	+ 2 1/2 Tage	1 000—Ms.	—		
	10 000—Ms.	+ 24 St.	10 000—Ms.	+ 2 1/2 Tage		

Hund Nr. 25 erhielt subcutan 800 000 Ms. pro 1 g Körpergewicht. 23 Stunden später wurden Blut und Cerebrospinalflüssigkeit auf Antitoxingehalt untersucht. Die Ergebnisse der Prüfungen stehen in Tafel 10.

Tafel 10.

Zeit nach der Injection	Cerebrospinalflüssigkeit		Blutserum	
	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
23 St.	1000—Ms.	○	4000 000—Ms.	○
	10000—Ms.	=	8000 000—Ms.	+ 3 1/2 Tage

Eine kleine Beimischung vom Blute fand während der Entnahme der Cerebrospinalflüssigkeit mittelst Lumbalpunktion

bei beiden Hunden statt und macht sich wohl in den Prüfungen bemerkbar.

Wir entnehmen aus den beiden Tafeln, dass das Tetanusantitoxin nach intravenöser sowie nach subcutaner Injection nur spurenweise in der Cerebrospinalflüssigkeit nachweisbar war, obschon das gleichzeitig entnommene Blut stark antitoxisch wirkte.

Eine Erweiterung dieser Ergebnisse stellt der folgende Befund dar: Von einem isopathisch immunisirten Pferd entnahm ich eine Blutprobe und gleichzeitig etwas Cerebrospinalflüssigkeit und stellte vergleichende Prüfungen an. Die Cerebrospinalflüssigkeit war wasserklar und frei von jeder Verunreinigung mit Blut. Die Resultate der Prüfungen sind in Tafel 11 wiedergegeben.

**Tafel 11. Pferd Nr. 4.**

Cerebrospinalflüssigkeit		Blutserum	
Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf	Prüfung auf 1 ccm. enthält	Verlauf
800000—Ms.	○	200000000—Ms.	○
1600000—Ms.	+ 36 St.	240000000—Ms.	+ 4 1/2 Tage

Demnach enthielt das Pferdeserum ca. 5 Antitoxineinheiten in 1 ccm., die Cerebrospinalflüssigkeit dagegen nur ca.  $\frac{1}{50}$  A. E. = den  $\frac{1}{250}$  Theil.

Es ist also bewiesen, dass bei der Anwesenheit von viel Antitoxin im Blute auch die Cerebrospinalflüssigkeit antitoxische Eigenschaft besitzt, wenn auch in viel kleinerem Maasse als das Blut.

• Es wird ferner in Tafel 9 sehr deutlich zum Ausdruck gebracht, wie wenig Gemeinschaftliches die Lymphe mit der Cerebrospinalflüssigkeit hat, denn der Antitoxingehalt der letzteren steht weit unter dem der ersteren.

Die Beobachtungen über die Verhütung des Tetanusgiftes nach Injection in den subarachnoidalen Raum gaben nun Veranlassung zu der Frage: Wie entsteht denn der cerebrale Tetanus? Bekanntlich haben Roux und Borrel<sup>1)</sup> einen besonderen sogenannten cerebralen Tetanus beschrieben, welcher nach intracerebraler Injection bei Kaninchen und Meerschweinchen auftritt und durch heftige epileptische Krämpfe, motorische Störungen u. s. w. charakterisirt wird. Da nun das intracerebral eingespritzte Gift in den subarachnoidalen Raum kommt, so fragt es sich: Was für eine Art Tetanus sehen wir, wenn wir das Gift statt durch den Schädel per Lumbalpunktion in diesen Raum bringen?

#### Versuch IX.

##### Injection von Tetanusgift mittelst Lumbalpunktion.

###### Protokoll 9.

Hund Nr. 24, 6900 g	25. Juni 1900, 9 $\frac{1}{2}$ Uhr Morgens. 1 ccm. Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900. Mittelst Lumbalpunktion eingespritzt = ca. 850 + Ms. pro 1 g. Sectionsbericht: Einstichstelle im Rückenmark deutlich vernehm- bar.	26. Juni 1900 Morgens ○ Abends ○ 27. Juni Morgens die Hinterbeine etwas steif. Mittags alle 4 Beine steif, Kopf zurück gezogen. Die leiseste Berührung ruft schwere Streck- krämpfe hervor.
------------------------	---	--

###### Protokoll 10.

Meerschwein- chen Nr. 954, 450 g	25. Juni 1900, 9 Uhr Morgens. 0,2 Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900. Mittelst Lumbalpunktion eingespritzt = ca. 2666 + Ms. pro 1 g. Section: Einstichstelle im Rücken- mark deutlich wahrnehmbar.	Bis 5 Uhr Abends keine Krämpfe noch Starre, später ent- wickelte sich eine allgemeine Starre. Um 8 Uhr Abends war das Thier ganz steif und um 10 Uhr todt.
--	---	--

<sup>1)</sup> Roux et Borrel, Annales Pasteur 1898, Nr. 4.

Protokoll 11.

Kaninchen Nr. 157, 1070 g	25. Juni 1900, 10 Uhr Morgens. 0,2 Tet.-G. Nr. 5, 14. V. 1900. Mittelst Lumbalpunktion eingespritzt = ca. 1100 + Ms. pro 1 g. Section: Einstichstelle im Rücken- mark deutlich wahrnehmbar.	Bis Abends 6 Uhr keine Krämpfe; am nächsten Morgen mit allgemeinem Tetanus gefunden. Abends todt.
------------------------------	--	--

Es ergibt sich hieraus die auffallende Thatsache, dass die Injection von Tetanusgift in den subarachnoidalen Raum mittelst Lumbalpunktion nicht cerebralen, sondern gewöhnlichen Tetanus mit Starrkrampf und ohne epileptische Erscheinungen hervorruft.

Eine Erklärung für diese Beobachtung suchend, änderte ich die Versuchsanordnung insofern, dass ich gleich vor oder gleich nach der Injection des Giftes 0,2 ccm. einer 0,85%igen Kochsalzlösung intracerebral einspritzte.

Protokoll 12.

Kaninchen Nr. 4, 1200 g	13. Juli 1900. 9 $\frac{1}{2}$ Uhr Morgens. 0,4 ccm. Tet.-G. Nr. 5, 6. VII. 1900. Mittelst Lumbalpunktion eingespritzt = ca. 2000 + Ms. pro 1 g Gleich darauf 0,2 ccm. Kochsalz- lösung intracerebral. Section: Die Einstichstelle im Ge- hirn und im Rückenmark deutlich wahrnehmbar.	Gegen 2 Uhr aus- gesprochene heftige epileptische Krämpfe, welche sich zunächst in den Nackenmuskeln zeigten. Die Krämpfe wurden allmählich heftiger, so dass das Thier oft umgeworfen wurde. Gegen 6 Uhr Abends im Krampfe todt.
----------------------------	--	--

In diesem Versuch wurde also die Gehirnsubstanz durch den Einstich und die Injection von Kochsalzlösung verletzt und nun sah ich nach Giftinjection mittelst Lumbalpunktion charakteristischen cerebralen Tetanus auftreten.

Zuletzt wollte ich ermitteln, welches die Folgen einer Verletzung des Gehirns bei intravenöser Injection des Giftes sein würden.



Kaninchen Nr. 5, 680 g	19. Juli 1900, 9 Uhr Morgens. 1 ccm. Tet.-G. Nr. 5, 6. VII. 1900. intravenös. = ca. 8900 + Ms. pro 1 g. 5 Minuten später 0,2 ccm. 0,85%iger Kochsalzlösung intracerebral.	Bis Abends 7 Uhr keine Krämpfe. 20. Juli Allgemeiner Tetanus, Abends todt.
---------------------------	---	--

Protokoll 14.

Meerschwein- chen Nr. 992 465 g	9. Juli 1900, 9 Uhr Morgens. 1 ccm. Tet.-G. Nr. 5, 6. VII. 1900, intravenös = ca. 12000 + Ms. pro 1 g. 5 Minuten später 0,2 ccm. 0,85%iger Kochsalzlösung intracerebral.	8½ Uhr Abends + an allgemeinem Tetanus, ohne Krämpfe gehabt zu haben.
---------------------------------------	--	---

Es scheint hiernach nicht möglich zu sein, cerebralen Tetanus durch intravenöse Giftinjection hervorzurufen, auch dann nicht, wenn man kolossale Giftmengen gibt und das Gehirn mittelst Nadelstich verletzt.

Nach diesen Ergebnissen dürfen wir wohl den Schluss ziehen: Zur Entstehung des Symptomencomplexes, welchen Roux und Borrel cerebralen Tetanus nannten, sind eine Verletzung des Gehirns und die direkte Application des Giftes erforderlich.

In Bezug auf das Vorhergehende wird es auch von Interesse sein, einen anderen Punkt in Erwägung zu ziehen. Wenn man nämlich grössere Giftdosen intracerebral injicirt, so wird die Incubationszeit des cerebralen Tetanus beträchtlich gekürzt. So habe ich bei Meerschweinchen nach intracerebraler Injection von 0,2 ccm. einer 1%igen wässerigen Tetanusgiftlösung die Symptome innerhalb 40 Minuten auftreten, den Tod schon in 4—5 Stunden erfolgen sehen. Bei Meerschweinchen Nr. 813 (Protokoll 1) fingen die Krämpfe eine knappe Stunde nach der Injection an. Bei Kaninchen Nr. 1 und Nr. 3 (Protokolle 4 und 6) war die Incubationszeit nach Minuten zu berechnen; bei Kaninchen Nr. 2 (Protokoll 5) dagegen, nach Einspritzung einer dünneren Lösung, dauerte

es ungefähr 30 Stunden, ehe die Krankheit einsetzte. Andererseits lässt sich eine solche Abkürzung der Incubationszeit nach intravenöser oder subcutaner Injection nicht erreichen, sogar nicht nach Injection mittelst Lumbalpunktion, wenn nicht das Gehirn verletzt wird. Ich habe kolossale Giftdosen angewendet, z. B. bei Meerschweinchen Nr. 992 (Protokoll 14) etwa das 36 000fache Multiplum der tödlichen Minimaldosis, ohne eine Incubationszeit von weniger als 6—8 Stunden erzielen zu können. Kurz gesagt, je unmittelbarer und concentrirter man das Gift an die Nervzellen bringt, desto kürzer wird die Incubationszeit.

In letzter Zeit hat man die Behandlung von Tetanus durch subdurale (Lumbalpunktion) Einführung des Antitoxins befürwortet.<sup>1)</sup> Die Resultate, soweit sie mir bekannt sind, können nicht als überwiegend günstig bezeichnet werden und ich glaube, dass bei weiterer Besprechung dieser Frage zwei Thatsachen nicht ausser Acht gelassen werden sollten, nämlich:

1. In der Cerebrospinalflüssigkeit ist kein oder fast kein Gift zu finden;

2. das subdural eingeführte Antitoxin geht schnell und fast vollständig aus dem subarachnoidalen Raum in die Blutbahn über.

Meine Versuche sind zwar nur an Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden gemacht und demnach nicht ohne Weiteres zu Schlüssen für die Behandlung von Menschen brauchbar, sie können aber als Wegweiser für weitere Untersuchungen dienen.

Die Ergebnisse der ganzen Arbeit lassen sich folgendermaassen kurz zusammenfassen:

Subarachnoidal eingespritztes Tetanustoxin bzw. Antitoxin fängt bald nach der Injection an in die Blutbahn überzugehen, und zwar folgt fast das ganze injicirte Antitoxin diesem Wege.

---

<sup>1)</sup> Blumenthal und Jacob, Berl. klin. Wochenschr., 1898, Nr. 49.  
Sicard, Comp. rend. d. l. Société de Biologie, 1898, S. 1058.

Eine Erhöhung der normalen giftneutralisirenden bezw. giftbindenden Kraft der Substanz des Centralnervensystems lässt sich nach subarachnoidaler Injection von Antitoxin *in vitro* nicht nachweisen; nach Giftinjection dagegen zeigt sich die Nervsubstanz giftiger, als mit Rücksicht auf das miteinander geschlossene Blut zu erwarten wäre.

Die Versuche unterstützen in kräftiger Weise die Annahme, dass das Tetanustoxin im Centralnervensystem gebunden wird, sie deuten ferner darauf hin, dass sich diese Bindung etwas allmählich vollzieht.

Nach subarachnoidaler Injection gelingt es nicht, das ganze Gift wieder aufzufinden: ein Theil ist in der Cerebrospinalflüssigkeit, ein anderer Theil ist in das Blut und in die Lymphe übergegangen und ein Theil lässt sich im Centralnervensystem nachweisen, aber eine beträchtliche Menge ist verloren gegangen. Die Ergebnisse der Versuche stellen die Vermuthung nahe, dass dieses merkwürdige Verschwinden, welches auch nach intravenöser Injection beobachtet worden ist, wenigstens zum Theil auf ein Festmachen des Giftes von Seiten des Centralnervensystems zurückzuführen ist.

Nach intravenöser bezw. subcutaner Injection tritt kein oder beinahe kein Gift in der Cerebrospinalflüssigkeit auf (Hund), auch dann nicht, wenn die Giftmenge ein grösseres Multiplum der tödtlichen Minimaldosis war.

Wenn das Blut einen sehr hohen Antitoxinwerth hat, so wirkt auch die Cerebrospinalflüssigkeit antitoxisch, aber in viel kleinerem Maasse als das Blut.

Vom physiologischen Standpunkt aus ist es interessant, dass das Tetanusgift wie das Tetanusantitoxin nur in sehr kleinem Maasse aus der Blutbahn in die Cerebrospinalflüssigkeit übertritt, obschon beide schnell und in bedeutender Menge aus dem Blute in die Lymphe übergehen. In umgekehrter Richtung, aus dem subarachnoidalen Raum in das Blut bezw. in die Lymphe, ist der Strom ein lebhafter für beide Stoffe.

---

## Ueber das „Invertin“ der Hefe.

Von  
**E. Salkowski.**

---

(Ans dem chem. Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 8. November 1900.)

---

Einige Zeit nach meiner Publication über die Kohlehydrate der Hefe<sup>1)</sup> drängte sich mir der Verdacht auf, dass das «Invertin», welches M. Barth<sup>2)</sup> vor langen Jahren unter meiner Leitung dargestellt und beschrieben hat, mit Kohlehydraten, namentlich Gummi, verunreinigt sein möchte. Diese Vermuthung gründete sich darauf, dass das Invertin im Wesentlichen durch Ausziehen der bei 105° erhitzten Hefe mit Wasser und Fällung des Auszuges mit Alkohol dargestellt ist, das Hefegummi aber gleichfalls in Wasser löslich und durch Alkohol fällbar ist und durch Erhitzen auf 105° nicht unlöslich wird.

Meine Vermuthung bestätigte sich in der That. Es stand mir noch eine kleine Probe des Originalpräparates von Barth zur Verfügung: als die wässerige Lösung eines Theiles desselben mit Fehling'scher Lösung versetzt wurde, entstand der charakteristische, beim Erwärmen sich zusammenballende bläulich-weiße Niederschlag der Gummikupferverbindung. Derselbe wurde nach dem Abgiessen der überstehenden Flüssigkeit mit etwas Wasser abgespült, dann in einigen Tropfen Salzsäure gelöst, die Lösung mit Alkohol absolutus versetzt; es entstand ein pulveriger, weißer Niederschlag, welcher abfiltrirt und mit Alkohol und Aether gewaschen wurde. Das erhaltene

---

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 492 und 3325, 1894.

2) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 11, S. 474, 1878.

Eigenschaften und in seinem Verhalten zu Reagentien, soweit die kleine Quantität die Anstellung von Reactionen zuließ, mit Hefegummi überein.

Dass diese Verunreinigung des «Invertins» mit Gummi bezw. Kohlehydraten von Barth und mir übersehen worden ist, ist wohl verzeihlich, da im Jahre 1878 — in dieses Jahr fällt die Publication von Barth — so gut wie nichts von den Kohlehydraten der Hefe bekannt war<sup>1)</sup> und wir auch nicht durch besondere Erscheinungen auf die Vermuthung dieser Verunreinigung geführt wurden, indessen hatte ich, da Barth damals unter meiner Leitung gearbeitet hat und die Darstellung des Invertins im Wesentlichen nach meinen Angaben erfolgt ist, natürlich die Verpflichtung, auf den Gehalt des «Invertins» an Gummi aufmerksam zu machen. Die Verzögerung, die in dieser Hinsicht eingetreten ist, erklärt sich daraus, dass ich selbstverständlich den Befund nicht veröffentlichen wollte, ohne selbst neue Darstellung von «Invertin» gemacht und mich von der Constanz des Gummigehaltes überzeugt zu haben. Bei der Beschäftigung mit dem Gegenstand drängten sich mir noch andere Fragen auf, die ich nicht ganz unberücksichtigt lassen konnte und deren Verfolgung viel Zeit in Anspruch nahm. Meine bezüglichen Beobachtungen sind nun bei Weitem noch nicht abgeschlossen und ich würde mit der Mittheilung derselben auch noch zurückhalten, wenn nicht die neuesten Publicationen von Osborne<sup>2)</sup> und Kölle<sup>3)</sup> die Frage nach der Natur des Invertins in falsche Bahnen zu drängen drohten.

---

1) Die Arbeit von Naegeli und Löw, in welcher die Autoren «Pilzschleim» als das Kohlehydrat der Hefe beschreiben, erschien in demselben Jahre, jedoch etwas später. Ausserdem heisst es daselbst (Annal. der Chem. und Pharm., Bd. 193, S. 324): «Der Pilzschleim ist löslich in heissem Wasser, fast unlöslich in kaltem» und Naegeli spricht sich dahin aus, dass derselbe erst aus der Zellmembran beim Kochen mit Wasser entstehe, es wäre also unter keinen Umständen eine Verunreinigung des «Invertins» mit demselben zu vermuthen gewesen, auch wenn die Arbeit von Naegeli und Löw schon vorgelegen hätte.

2) Diese Zeitschr. Bd. XXVIII, S. 399.

3) Diese Zeitschr. Bd. XXIX, S. 428.

Die Darstellung des Invertins geschah im Wesentlichen nach dem von Barth beschriebenen Verfahren, nur mit den Abweichungen, welche durch die inzwischen erfolgte Verbesserung der technischen Hilfsmittel und durch die grössere persönliche Erfahrung in der Darstellung derartiger Substanzen geboten waren.

500 g beste, fast vollkommen amylnumfreie Presshefe wurde durch Ausbreiten in grossen Porzellanschalen oder auf Blechen oder Papierunterlagen bei Zimmertemperatur getrocknet, bis sie sich gut verreiben liess. Das lufttrockne Pulver zuerst bei 40° weiter getrocknet, dann 6 Stunden lang auf 105—110° erhitzt, fein gemahlen und mit Wasser zu einem dünnen Brei angerührt, welcher 20—24 Stunden stehen blieb. Derselbe wurde dann mit der Nutsche abgesaugt, das gelblich gefärbte Filtrat in das 4—5fache Volumen Alkohol von 90—93% eingegossen, am nächsten Tage abfiltrirt und mit Alkohol absolutus gewaschen, der Filtrerrückstand einen Tag unter Aether gebracht, wiederum abgesaugt und in der Reibschale trocken gerieben. Das ganz trockene Pulver wurde in der Reibschale mit Wasser verrieben, nach kurzem Stehen filtrirt — der Filtrerrückstand besteht grösstentheils aus Eiweisskörpern —, das Filtrat in das mehrfache Volumen Alkohol absolut. gegossen und ebenso verfahren, wie oben angegeben. Durch Trockenreiben der ätherfeuchten Substanz in einer Reibschale wird das «Invertin» in Form eines weissen oder ganz leicht gelblich-weissen, äusserst feinen staubigen Pulvers erhalten, welches, wie so viele sehr feinpulvrige organische Substanzen, beim Reiben die bekannten elektrischen Erscheinungen zeigt, die das Einfüllen in Gläser und Ausschütten aus Röhrchen für die quantitativen Bestimmungen so sehr erschweren.<sup>1)</sup>

Es wurden 4 derartige Darstellungen gemacht, nur mit einer kleinen Abweichung bei der ersten Darstellung, welche

---

<sup>1)</sup> Da es sich später herausstellte (siehe weiter unten), dass das invertirende Enzym gegen Alkohol weit empfindlicher ist, als ich annahm, so würde es sich empfehlen, die Berührung mit dem Alkohol möglichst abzukürzen, freilich fragt es sich, ob es dann in gleichem Maasse gelingen wird, das Eiweiss aus dem Präparat auszuschliessen.

sich indessen als unzweckmässig und fehlerhaft erwies. Es wurde nämlich dieses Mal der Versuch gemacht, die Hefe, gut vertheilt, sofort bei 35° zu trocknen. Dabei trat aber augenscheinlich Zersetzung unter Ammoniakentwicklung ein. Aus dieser nicht ganz fehlerfreien Darstellung stammt Präparat I. Das Ergebniss der zweiten und dritten Darstellung wurde zu Präparat II vereinigt, die vierte Darstellung ergab das Präparat III. Ueber die Ausbeute bei I finde ich keine Notiz, Präparat II wog lufttrocken ca. 4 $\frac{1}{2}$  g, ebensoviel Präparat III, trotzdem für II 1 Kilo, für III nur  $\frac{1}{2}$  Kilo zur Darstellung verwendet worden war. Der Unterschied der Gewichte erklärt sich durch die Zusammensetzung der Präparate (siehe weiter unten).

Bezüglich der Wirksamkeit der Präparate habe ich mich auf qualitative Versuche beschränkt, da Barth ausführliche Angaben über die Wirksamkeit seiner nach dem gleichen oder fast gleichen Verfahren dargestellten Präparate gemacht hat. Nach den qualitativen Prüfungen entsprach die Wirksamkeit doch nicht dem, was man von einem rein dargestellten «Ferment» gegenüber der Wirksamkeit der zur Darstellung verwendeten wässerigen Auszüge erwarten musste; auch andere Beobachter haben schon bezüglich des Invertins diesen Eindruck erhalten. Das Verfahren bedingt jedenfalls eine bedeutende Schädigung des Fermentes.

Sämmtliche Präparate erwiesen sich als gummihaltig, auffallender Weise aber in sehr verschiedenem Grade. Es schien mir wünschenswerth, zunächst den Gehalt der Präparate an Gummi zu bestimmen und dann dieses selbst näher zu charakterisiren. Zur Bestimmung diente die Fällung als Gummikupfernatronverbindung und Isolirung des Gummis aus dieser. Von der Brauchbarkeit des Verfahrens habe ich mich schon vor längerer Zeit in Versuchen über die Quantität des Gummis in der Hefe bei verschiedenen Zuständen derselben überzeugt, es soll über diese später im Zusammenhang berichtet werden. Die Einzelheiten des Verfahrens gehen aus der Beschreibung des bei Präparat I eingehaltenen Vorgehens hervor.

### Invertinpräparat I.

0,4359 g lufttrockenes Invertin = 0,3363 g<sup>1)</sup> asche- und wasserfrei wurden aus einem Wägeröhrchen auf etwa 100 ccm. destillirtes Wasser ausgeschüttet, welches sich in einem Becherglas befand, und zwar so, dass das Pulver möglichst auf der Oberfläche des Wassers schwimmend vertheilt war, dann einige Stunden stehen gelassen, dann auf dem Wasserbad erwärmt, die Lösung der Substanz, welche nur zögernd erfolgt, durch Umrühren mit einem mit Gummi armirten Glasstab befördert, schliesslich einige Tropfen Natronlauge hinzugesetzt. Dabei schied sich eine geringe Quantität eines flockigen Niederschlages — augenscheinlich Calciumphosphat — aus, welcher in der Flüssigkeit belassen wurde, da er die Gummibestimmung nicht stört.

Die erkaltete Lösung wurde mit 20 ccm. Fehling'scher Lösung versetzt und gelind erwärmt, wobei sich ein dicker, weiss-bläulicher, allmählich sich zusammenballender Niederschlag ausschied. Sobald derselbe sich abgesetzt hatte, wurde die überstehende Flüssigkeit in ein Becherglas abgossen, wobei einige Flöckchen des Niederschlages mitgingen, dann mit wenig Wasser abgespült, das Spülwasser in dasselbe Becherglas gegossen; die vereinigten Flüssigkeiten — etwa 200 ccm. — blieben bis zum nächsten Tage stehen. Die Gummikupferverbindung wurde in wenigen Tropfen Salzsäure gelöst — die Lösung erfolgte spielend leicht —, dann sofort 100—150 ccm. Alkohol absolutus hinzugefügt: es entstand eine milchige Flüssigkeit. Da die Ausscheidung des Gummis zögerte, wurde mit der Pipette ein Tropfen 10%ige Kochsalzlösung hinzugesetzt: es entstand sofort ein dicker, weisser Niederschlag, welcher bis zum nächsten Tage unter Alkohol stehen blieb. Aus der abgossenen blauen Lösung, mit welcher die Spülwässer vereinigt worden waren, hatten sich bis zum nächsten Tage einige wenige Flöckchen abgesetzt, aus welchen gleichfalls in der beschriebenen Weise das Gummi zur Ausscheidung gebracht und sofort mit der Hauptquantität vereinigt wurde. Diese zweite Quantität war übrigens so minimal, dass sie auch ohne merklichen Fehler hätte vernachlässigt werden können.

Das Gummi wurde auf einem getrockneten, gewogenen Filter gesammelt, sorgfältig mit Alkohol und Aether gewaschen, dann bei 110—115° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und gewogen.

Es wurden erhalten 0,1798 g = 53,47% der Reinsubstanz des Invertinpräparates.

---

1) 0,3194 g verloren bei anhaltendem Trocknen 0,0342 g Wasser = 10,71% und hinterliessen 0,0388 g Asche = 12,15% der wasserhaltigen oder 13,07% der wasserfreien Substanz. Der Gehalt des lufttrockenen Präparates an «Reinsubstanz» betrug 77,14%.



## Invertinpräparat II.

Da die Quantität des Gummis sich für die Bestimmung bei Präparat I unbequem gross erwiesen hatte, wurde, in der Erwartung, dass der Gummigehalt ungefähr ebenso gross sein würde, weniger Substanz genommen.

0,2740 g = 0,1854 g asche- und wasserfreie Substanz<sup>1)</sup> lieferte 0,0318 g Gummi = 17,17 %.

Die Ausscheidung der Gummikupferverbindung erfolgte in diesem Falle nicht sofort, sondern allmählich, was bei der geringen Concentration des Gummis in der Lösung (etwa 1:3140) erklärlich ist.

## Invertinpräparat III.

1) 0,2218 g = 0,1866 g<sup>2)</sup> asche- und wasserfreie Substanz lieferte 0,1208 g Gummi = 64,88 %.

2) 0,1724 g bei 115° getrocknete aschehaltige Substanz = 0,1591 g aschefreie Substanz lieferte 0,1046 g Gummi<sup>3)</sup> = 65,71 %, Mittel aus beiden Bestimmungen 65,3 %.

Die 3 untersuchten Invertinpräparate enthielten also Gummi in sehr wechselnder Quantität: Nr. 1 53,47 %, Nr. 2 17,17 %, Nr. 3 im Mittel 65,3 %. Der hohe Gummigehalt des

---

1) 0,3944 g Substanz verloren bei anhaltendem Trocknen 0,0266 g Wasser = 6,75 % und hinterliessen 0,1009 g Asche = 25,58 % der lufttrockenen oder 24,73 % der wasserfreien Substanz. Der Gehalt der lufttrockenen Substanz an Reinsubstanz betrug somit 67,67 %. Da der Aschengehalt auffallend hoch erschien, wurde noch eine zweite Aschenbestimmung ausgeführt, welche indessen fast dasselbe ergab. 0,2186 g lufttrockene Substanz lieferte 0,0550 g Asche = 25,25 %.

2) 0,3784 g verloren bei anhaltendem Trocknen 0,0326 g Wasser = 8,88 % und hinterliessen 0,0264 g Asche = 6,98 % der wasserhaltigen oder 7,66 % der wasserfreien Substanz. Der Gehalt der lufttrockenen Substanz an «Reinsubstanz» betrug somit 83,44 %.

3) In diesem Falle ist eine Correctur angebracht. Beim Abfiltriren des Gummis fiel mir auf, dass die letzten Antheile desselben eine körnige Beschaffenheit hatten. Ich vermuthete, dass der Alkohol Chlornatrium ausgefällt haben könnte, und veraschte deshalb das erhaltene Gummi. Dasselbe hinterliess 0,0088 g geschmolzene Asche, welche, von dem Gewicht des Rohgummis = 0,1134 g abgezogen, obige 0,1046 g gaben. Es wird zweckmässig sein, die Veraschung in jedem Falle auszuführen.

Präparates III gegenüber dem relativ niedrigen in II erklärt nun auch, warum die Ausbeute bei III doppelt so hoch war, wie in II; das Plus ist nichts Anderes wie Gummi.

Eine bestimmte Erklärung dafür, warum in dem einen Falle soviel mehr Gummi in Lösung gegangen ist, wie in dem anderen, also ein soviel gummireicheres Präparat erhalten ist, vermag ich nicht zu geben, man kann sich aber wohl vorstellen, dass die Quantität des Gummis in der Hefe vielleicht nach den Einzelheiten der Fabrikation oder nach dem Alter der Hefe wechselt und dass dementsprechend Wasser von Zimmertemperatur wechselnde Quantitäten von Gummi aufnimmt. Möglicher Weise sind auch geringe Abweichungen bei der Darstellung — längere oder kürzere Zeit der Maceration des Hefepulvers mit Wasser — von Einfluss auf den Gummigehalt.

Es bleibt nun noch übrig, den Beweis zu führen, dass das gefundene Kohlehydrat in der That Hefegummi ist. Der Beweis liegt in Folgendem: Sämmtliche gewogenen Niederschläge erwiesen sich, mit der Lassaigne'schen Probe unter Anwendung von Kalium auf Stickstoff geprüft, als stickstofffrei; nach Lage der Dinge konnte es sich also nur um ein Kohlehydrat handeln. Von löslichen Kohlehydraten ist ausser dem Gummi in der Hefe nur noch Glycogen nachzuweisen, welches ich übrigens, entgegen der gewöhnlichen Annahme, nicht für identisch mit dem thierischen Glycogen halte. Die wässerige Lösung des Invertins gibt keine Jodreaction, wie auch nicht anders zu erwarten war, da man aus der Hefe «Glycogen» nur durch Erhitzen mit Wasser erhält. Zudem ist Glycogen nicht durch Fehling'sche Lösung fällbar und die Art der Isolirung des Kohlehydrats schliesst eigentlich jedes andere Kohlehydrat aus. Mit Rücksicht auf die Angaben von Kölle (l. c.) über die Bildung von Mannose aus seinem Invertin hielt ich es aber doch für wünschenswerth, den Nachweis des Gummis auch nach dieser Richtung hin zu liefern.

Ich muss hierbei etwas weiter ausholen. Von dem Hefegummi, über welches ich zuerst in du Bois-Reymond's Arch. f. Physiol., 1890, S. 455, Angaben machte, theilte ich in den

Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 27, 1894, S. 601 mit, dass es durch Säuren in einen gährungsfähigen, schwach rechtsdrehenden Zucker übergeht. Es zeigte sich dann, dass unabhängig von mir auch Hessenland<sup>1)</sup> den Körper schon 1892 in Händen gehabt hat, wenn auch wohl nicht so rein, da er nicht die Fällung mit Fehling'scher Lösung angewendet hat und das Gummi nach seiner Darstellung wohl mit Glycogen verunreinigt sein konnte. Seine Angaben waren mir in Folge des Ortes der Publication ebenso entgangen, wie ihm die meinigen aus dem Jahre 1890. Hessenland hat auch den bei der Hydrolyse des Gummis entstehenden Zucker schon untersucht und gefunden, dass er aus einem Gemisch von d-Mannose mit wenig Dextrose besteht.

Da hier im Hinblick auf die Angaben von Kölle nur die d-Mannose von Interesse war, so habe ich mich darauf beschränkt, zu untersuchen, ob diese leicht aus dem Hefegummi und dem aus dem «Invertin» isolirten Kohlehydrat zu erhalten ist.

Ca. 4 g lufttrockenes Hefegummi, nach dem früher von mir (l. c.) beschriebenen Verfahren aus Presshefe dargestellt, wurden mit 300 ccm. 5%iger Schwefelsäure (15 g mit Wasser auf 300 ccm. gebracht) in einem Kolben 6 Stunden im Wasserbad (der Kolben in dieses versenkt) erhitzt, von Zeit zu Zeit das verdampfte Wasser ersetzt. Ab und zu wurden Proben der Flüssigkeit durch Neutralisation mit Natronlauge und Zusatz von Fehling'scher Lösung auf Gehalt an Gummi geprüft: nach der angegebenen Zeit fiel die Gummireaction negativ aus. Die Flüssigkeit wurde nun mit heisser Barytlösung (aus umkrystallisirtem Aetzbaryt) nahezu, dann mit Baryumcarbonat vollends neutralisirt, vom Baryumsulfat abfiltrirt, die klare farblose Lösung in einer grossen Schale bei gelinder Temperatur auf dem schwach erhitzten Wasserbad eingedampft, von etwas ausgeschiedenen Baryumcarbonat abfiltrirt und, nachdem eine Probe zur Anstellung von Zuckerreactionen abgenommen war, die noch etwas eingeengte abgekühlte Lösung mit einigen

---

1) Zeitschrift des Vereins für Rübenzuckerindustrie, Bd. 42, S. 671.

ccm. Phenylhydrazin, in 30%iger Essigsäure bis zur schwach sauren Reaction gelöst, versetzt. Beim Umrühren erstarrte die Flüssigkeit zu einem dünnen Brei von Krystallen, welche abfiltrirt, ausgewaschen und einmal aus Alkohol umkrystallisirt wurden.

Zur Identificirung des in kleinen, schwach gefärbten Krystallen erhaltenen Mannosehydrazons wurde an der über Schwefelsäure getrockneten Substanz eine N-Bestimmung nach Dumas ausgeführt.<sup>1)</sup>

0,1682 g gaben 15,5 ccm. N bei 21° und 755 mm. B.  
Daraus berechnen sich 0,0175 g N = 10,40%.

Mannosehydrazon erfordert 10,37%.

Es wurden nun die Reste der bei den Untersuchungen der Invertinpräparate auf Gummi erhaltenen Substanzen vereinigt, dann noch aus ca. 1 g des Präparates III Gummi dargestellt und mitverarbeitet, im Ganzen betrug die Quantität 0,7—0,8 g. Die Substanz wurde mit 150 ccm. 5%iger Schwefelsäure in der angegebenen Weise behandelt. Die erhaltene eingedampfte Lösung gab mit essigsauerm Phenylhydrazin sofort das charakteristische Hydrazon vom Schmelzpunkt 199° nach einmaligem Umkrystallisiren aus Alkohol. Zum Ueberfluss wurde noch die N-Bestimmung ausgeführt.

0,1905 g gaben 17,0 ccm. N bei 16° und 769 mm. Bar.

Daraus berechnet sich  $N = 0,0200 \text{ g} = 10,50\%$ , erfordert 10,37%.

Es steht also fest, dass das nach dem Barth'schen bezw. meinem Verfahren dargestellte Invertin mit Hefegummi verunreinigt ist.

Angesichts dieser Thatsache gewinnt nun die Angabe von Kölle, dass er durch Behandlung seines Invertins mit Säuren Mannose erhalten habe, eine ganz andere Bedeutung. Es ist nicht daran zu zweifeln, dass auch die von Osborne und Kölle erhaltenen Invertinpräparate mit Gummi verunreinigt gewesen sind, und sehr erklärlich, da diese Präparate im Wesentlichen nach demselben Verfahren dargestellt sind,

---

1) Die Elementaranalysen sind, ebenso wie die des Invertins, von dem Assistenten des Laboratoriums, Herrn Dr. C. Neuberg, ausgeführt.

jedenfalls keine Operation vorgenommen ist, durch welche das von vornherein vorhandene Gummi beseitigt wird. Die Dialyse ist, wie ich mich an Hefegummilösung überzeugt habe, nicht im Stande, diesen Effect zu leisten. Der Gehalt an Gummi ist vielleicht sogar in seinen Präparaten noch grösser gewesen, wie in den meinigen, weil Osborne (l. c., S. 408) die vorher mit Alkohol verriebene, dann wieder möglichst von Alkohol befreite Presshefe 6 Tage bei 30—35° mit Chloroformwasser stehen liess. Dadurch musste natürlich die Auslaugung des Gummis aus der Hefe ausserordentlich befördert werden. Ausserdem enthält der so erhaltene Auszug, wie ich mich überzeugt habe, auch reichlich die Spaltungsprodukte des Eiweisses und Nucleins, doch scheinen dieselben keine Verunreinigung des stark gummihaltigen «Invertins» zu bewirken.

Ich bin überzeugt: wenn Osborne und Kölle ihre Präparate durch Versetzen der Lösung mit Fehling'scher Lösung und Zugabe von ein wenig Natronlauge prüfen wollen, werden sie sich von der Gegenwart von Gummi in denselben leicht überzeugen können. Es handelt sich also in den Versuchen von Kölle nicht um aus dem Molekül des Invertins abgespaltene Mannose, diese entspricht vielmehr dem Gummi, durch welches sein Invertin verunreinigt war.

Osborne<sup>1)</sup> selbst wirft schon die Frage auf, ob seinem Invertin nicht vielleicht ein Kohlehydrat beigemischt sein könnte, erledigt sie aber durch die Gegenfrage, warum denn die von ihm dargestellte Substanz durchaus ein Gemenge sein müsse, und nicht vielmehr selbst das gesuchte Ferment, und als solches gleichzeitig stickstoffhaltig und kohlehydrathaltig sein könne. Er erinnert dabei an das Chitin und Hyalin, deren procentische Zusammensetzung er vergleichend mit der seines Invertins zusammenstellt, und sieht, wie es scheint, eine gewisse Stütze für seine Anschauung in dem Verhalten seiner Substanz beim Erhitzen mit Säuren. Seine Entscheidung in der Frage ist um so auffallender, als Wroblewsky<sup>2)</sup> schon angegeben hat, dass ein von ihm untersuchtes Invertinpräparat von Merck

---

<sup>1)</sup> l. c., S. 423.

<sup>2)</sup> Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 31, S. 1134.

beträchtliche Mengen eines Kohlehydrates enthält, wenn er auch die Natur dieses Kohlehydrates nicht erkannt hat, es vielmehr für von allen Kohlehydraten verschieden hält. Nach den Angaben von Wroblewsky ist kein Zweifel, dass er Hefegummi in Händen gehabt hat. Dafür spricht ganz besonders, dass sein Kohlehydrat keine Jodreaction gab, sich rechtsdrehend erwies, «nach der Inversion aber nur noch eine ganz geringe Rechtsdrehung vorhanden war». Alles dieses entspricht genau dem Verhalten des Hefegummis (Mannose ist bekanntlich schwach rechtsdrehend.) Hätte Wroblewsky meine Arbeit über die Kohlehydrate der Hefe in den Berichten der deutschen chemischen Gesellschaft nachgeschlagen, so würde er über die Natur seines Kohlehydrates wohl nicht im Zweifel geblieben sein.

Die noch vorhandenen Reste meiner Invertinpräparate habe ich zu einigen orientirenden Versuchen über die Natur der ausser dem Gummi noch darin enthaltenen organischen Substanz benutzt. Ich drücke mich absichtlich so aus und nicht des «Invertins», die Gründe dafür werden aus der späteren Ausführung hervorgehen.

1. Barth hat sich schon mit Bestimmtheit dahin ausgesprochen, dass das Invertin kein Eiweisskörper ist, Osborne ist derselben Ansicht, und ich muss beiden Autoren unbedingt beistimmen: das Invertin ist kein Eiweisskörper, auch nicht im weitesten Sinn des Wortes, Wroblewsky ist mit seiner gegentheiligen Ansicht durchaus im Unrecht.

Meine Invertinpräparate gaben, in Substanz angewendet — kleine Messerspitzen —, die Farbenreactionen der Eiweisskörper: Xanthoprotein-Reaction, Adamkiewicz's, Millon's, Liebermann's Reaction entweder gar nicht oder — ich möchte sagen — so schattenhaft, dass von vornherein kein Zweifel sein konnte, dass sie auf eine Verunreinigung mit Eiweiss zurückzuführen seien. Alle 3 Präparate verhielten sich gleich; dass in der That noch Spuren von Eiweiss vorhanden waren, liess sich leicht zeigen.

1 g des bei 105° bis zur Gewichtsconstanz getrockneten Präparates I wurde in 100 ccm. Wasser gelöst: dabei blieb eine geringe Quantität schleimiger Klümpchen ungelöst, welche

sich auch beim Erhitzen der Lösung bis zum Sieden nicht lösten, die Lösung wurde filtrirt, der Rückstand vom Filter in ein Becherglas gespritzt und in diesem durch Decantiren sorgfältig gewaschen. Die Substanz gab so in feuchtem Zustande intensive Millon'sche und Xanthoprotein-Reaction, sie löste sich in schwacher Natronlauge, auf Zusatz von Essigsäure zu dieser Lösung entstand eine feinflockige Fällung. Darnach unterliegt es keinem Zweifel, dass das Invertin I mit Eiweiss verunreinigt war. Dasselbe wurde auch an einer kleinen Quantität des Präparates II festgestellt.

Bezüglich der Reactionen der trockenen Substanz ist noch nachzuholen, dass dieselbe beim Erhitzen im Röhrchen reichlich Pyrrol entwickelte und Spuren von Schwefelwasserstoff. Die Pyrrolreaction ist so stark, dass sie sicher nicht auf die Verunreinigung mit Eiweiss zurückgeführt werden kann, sondern der Substanz selbst zukommt.

Bezüglich der Reactionen der nicht ganz 1%igen Lösung (siehe oben) kann ich mich kurz fassen, sie stimmten im Wesentlichen mit den Angaben Osborne's überein. Abweichend war Folgendes: 1. die Biuretreaction fiel bei mir ganz negativ aus, 2. Kupfersulfat und -acetat bewirkte keine Fällung oder Trübung, 3. Bleiacetat und Bleisubacetat bewirkte in der angegebenen Lösung eine leichte Trübung, in einer Lösung unbekannter Concentration aus dem Präparat II eine weit stärkere. Es ist wohl möglich, dass die beigemischten phosphorsauren Salze an der Bildung des Niederschlages theilgenommen sind, 4. Brücke'sches Reagens + Salzsäure bewirkte starke Opalescenz, indessen setzte sich auch bei tagelangem Stehen kein Niederschlag ab.

2. Die Elementarzusammensetzung. — Barth, Osborne und Kölle haben ihre Präparate analysirt und folgende Zahlen erhalten:

	C	H	N
Barth im Mittel...	44,44	8,4	5,95
Osborne <sup>1)</sup> .....	44,69	6,51	6,10
Kölle .....	43,9 bis 45,65	6,45 bis 7,34	8,32 bis 8,61 <sup>2)</sup>

1) Für das durch Dialyse gereinigte Invertin im Mittel.

2) Hinsichtlich des N-Gehaltes spricht Kölle selbst Zweifel aus.

Da es als sicher anzunehmen ist, dass alle analysirten Präparate Gummi enthielten, und zwar in unbekannter Quantität, so sind die Zahlen nicht direct verwerthbar, indessen könnte man doch an eine Umrechnung denken, wenn sich der N-Gehalt der gummifreien Substanz sicher ermitteln liesse. Daraus muss sich natürlich der Gummigehalt der analysirten Substanz ableiten lassen.

Die Elementaranalyse meines Präparates II ergab folgende Werthe:

1. 0,1588 g der bei 105° getrockneten Substanz (= 0,11523 g Reinsubstanz) gaben mit chromsaurem Blei und vorgelegtem metallischen Kupfer im offenen Rohr verbrannt: 0,2271 CO<sub>2</sub> und 0,0888 H<sub>2</sub>O;

2. 0,1560 g (= 0,1132 g Reinsubstanz) gaben 0,2247 CO<sub>2</sub> und 0,0870 H<sub>2</sub>O;

3. 0,1633 g (= 0,1185 g Reinsubstanz) gaben 8,9 ccm. N bei 21° und 756 mm. Bar.;

4. 0,1863 g (= 0,1351 g Reinsubstanz) gaben 9,8 ccm. N bei 20° und 757 mm. Bar.

Daraus berechnet sich in Procenten:

	I.	II.	III.	IV.
C	53,75	54,13	—	—
N	8,56	8,54	—	—
H	—	—	8,55	8,26

Im Mittel C 53,94%, H 8,55%, N 8,41%.

Da der Gehalt des analysirten Präparates an Gummi bekannt ist (= 17,17%) und andererseits die Zusammensetzung des Hefegummis (C 42,11%, H 6,43%<sup>1)</sup>), so lässt sich die Zusammensetzung des gummifrei gedachten Präparates leicht berechnen. Sie ergibt sich zu:

C 56,40%, H 8,99%, N 10,15%.

Selbstverständlich hat diese Angabe der Zusammensetzung, als auf einer indirekten Analyse beruhend und des hohen Aschegehaltes wegen, nur den Werth einer gewissen Annäherung. Es ist klar, dass von irgend einer Uebereinstimmung in der Zusammensetzung meines Präparates II und

1) Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. 27, S. 492.



der Präparate der genannten Natur, gemindert aber nicht die Rede sein kann, die Mühe der genaueren Berechnung glaubte ich mir ersparen zu können.

Die Analyse des bei 105—110° getrockneten Präparates III ergab folgende Werthe:

1. 0,2103 g (= 0,1942 g Reinsubstanz) gaben 0,3440 CO<sub>2</sub> und 0,1496 g H<sub>2</sub>O;

2. 0,1587 g (= 0,1466 g Reinsubstanz) gaben 7,3 ccm. N bei 17° und 760 mm. Bar.;

3. 0,1562 g (= 0,1442 g Reinsubstanz) gaben 7,4 ccm. N bei 17° und 760 mm. Bar.

Hieraus berechnet sich:

C	48,31	—	—
H	8,58	—	—
N	—	5,79	5,96

Die Substanz enthielt im Mittel von zwei nahe aneinanderliegenden Bestimmungen 65,30% Gummi. Daraus berechnet sich für die gummifreie Substanz die Zusammensetzung in Procenten:

C 59,99, H 12,54, N 16,86.

Wie diese Differenzen in meinen eigenen Präparaten<sup>1)</sup> und zu denen der früheren Untersucher zu erklären seien, ist einstweilen nicht zu sagen, jedenfalls geht aus den Ergebnissen hervor, dass man die Illusion, auf einem einfachen Wege zu einer einheitlichen Substanz zu gelangen, aufgeben muss; nach unseren jetzigen Kenntnissen über die complicirte Zusammensetzung des Zellinhaltes überhaupt und — worauf ich weiter unten noch zurückkomme — der Hefezellen im Besonderen, war dieses auch von vornherein höchst unwahrscheinlich. Ehe man aber an Trennungen innerhalb des stickstoffhaltigen Atomcomplexes denken kann, muss man erst einmal diesen frei von accessorischen Aschebestandtheilen und frei von Gummi

---

<sup>1)</sup> Möglicher Weise beruht sie darauf, dass der Gummigehalt in Präparat II in Folge der starken Verdünnung bei der Analyse (circa 1:3140, siehe oben S. 310) zu niedrig gefunden ist; leider konnte ich diese Vermuthung nicht prüfen, da ich nichts mehr von dem Präparat besass.

in Händen haben. Was das Freisein von Asche betrifft, so hat Osborne es durch sein Dialyseverfahren im Wesentlichen erreicht, und es wird schwerlich einen besseren Weg dazu geben. Die Trennung vom Gummi wird voraussichtlich grössere Schwierigkeiten machen. Es liegt sehr nahe, zu versuchen, ob man nicht an Stelle des Wassers, welches so reichlich Gummi löst, andere Extraktionsmittel für das erhitzte Hefepulver anwenden könnte. Dieser Weg scheint aber wenig aussichtsvoll zu sein. Ich habe als Extraktionsmittel Glycerin und alkoholhaltiges Wasser (1 Theil Alkohol, 2—3 Theile Wasser) benutzt, und zwar stets im Verhältniss von 10 g Hefepulver auf 100 ccm. des Extraktionsmittels und stets im Thermostaten bei 40° 24—48 Stunden lang. Was das Glycerin betrifft, so zeigte es sich, dass Glycerin von 1,23 D allerdings so gut wie nichts von Gummi löste, aber auch fast nichts von Ferment, verdünntes Glycerin (4 Vol. Glycerin, 1 Vol. Wasser) mehr Ferment auszog, aber auch reichlich Gummi.

Die Auszüge mit alkoholhaltigem Wasser erwiesen sich äusserst gummiarm, aber gänzlich wirkungslos. Die Unwirksamkeit kann entweder davon abhängen, dass das Enzym nicht in Lösung geht, oder davon, dass der Alkohol selbst in dieser Verdünnung bei 40° zerstörend auf das Ferment einwirkt. Die Entscheidung war sehr einfach. Von einem sehr energisch wirkenden Auszug aus erhitzter Hefe wurden zwei gleiche Antheile abgemessen, der eine mit  $\frac{1}{3}$  bis  $\frac{1}{2}$  des Volumens Alkohol versetzt, der andere mit ebensoviel Wasser, die Proben im Thermostaten aufbewahrt. Nach 24 Stunden erwies sich die mit Wasser versetzte Probe sehr energisch wirksam, die alkoholhaltige völlig unwirksam. Der Alkohol wirkt also auf das invertirende Ferment weit stärker ein, als man im Allgemeinen anzunehmen pflegt. Ich glaube nicht, dass andere Extraktionsmittel weiter führen werden.

Es bleibt also nur die Anwendung von Trennungsmitteln in der gemeinsamen Lösung von Ferment und Gummi oder die Behandlung der fertigen Präparate mit Lösungsmitteln übrig. In dieser Beziehung habe ich Folgendes festgestellt:

a) Die so vielfach mit Erfolg benutzte Anwendung von

Magnesiumsulfat, Ammonsulfat bewirkten, in wässrigen Hefensatz bis zur Sättigung eingetragen, überhaupt keine Fällung.

b) Die fractionirte Fällung mit Alkohol. Eine ca. 1%ige Lösung des Präparats III wurde mit dem gleichen Volumen Alkohol absolutus versetzt. Der relativ reichlich entstehende Niederschlag besteht überwiegend aus Gummi. Das Filtrat wird mit dem gleichen Volumen Alkohol versetzt, der spärliche Niederschlag enthielt nur sehr wenig Gummi. Das alkoholische Filtrat vom zweiten Niederschlag hinterliess übrigens überraschender Weise beim Verdunsten ein wenig eines fettigen, nicht P-haltigen Rückstandes, was um so auffallender ist, als das Präparat aus der wässrigen Lösung mit Alkohol ausgefällt und gut mit Aether gewaschen war. Der Gehalt an fettartiger Substanz, wenn er auch nur gering war, muss natürlich den Gehalt der Substanz an C und H in die Höhe treiben.

c) Die Behandlung mit Eisessig, bei welcher man von vornherein darauf verzichtet, ein wirksames Präparat zu erhalten, und auch an die Möglichkeit denken muss, ein essigsaures Derivat zu bekommen. Behandelt man ein gummihaltiges Präparat in der Wärme mit Eisessig und filtrirt nach dem Erkalten, so bleibt das Gummi ganz ungelöst und ist durch Abfiltriren, Auswaschen mit Eisessig, dann Alkohol absolutus und Aether vollkommen frei oder in anderen Fällen fast vollkommen frei von Stickstoff zu erhalten. Andererseits ist in der eisessigsäuren Lösung, wenn man erst nach dem Erkalten filtrirt, so gut wie nichts von Gummi enthalten. Versetzt man die eisessigsäure Lösung mit einer relativ grossen Quantität Alkohol absolutus, dann mit ebensoviel Aether (ebensoviel wie Alkohol), so fallen Flocken aus, welche frei von Gummi und ziemlich aschearm sind.

Nachträglich hat sich übrigens herausgestellt, dass man fast gummifreie und doch ziemlich energisch wirkende Auszüge erhält, wenn man das vorher (auf 110°) erhitzte Hefepulver nur etwa eine halbe Stunde mit Wasser bei Zimmertemperatur behandelt.

3. Die Asche des «Invertins» besteht hauptsächlich aus Phosphaten und zwar überwiegend aus Magnesiumphosphat neben wenig Calciumphosphat.<sup>1)</sup> Die wässrige Lösung der Asche, insoweit man von einer solchen sprechen kann, gibt allerdings auch schwache Phosphorsäurereaction, jedoch ist der Nachweis von Kalium (oder Natrium in entsprechender Quantität) nicht zu führen und die Phosphorsäurereaction könnte auch wohl von der Löslichkeit des Calciumphosphats in Wasser abhängen. Der grosse Reichthum von Phosphorsäure in der Asche legt den Gedanken nahe, dass der Phosphor wenigstens zu einem Theil organisch gebunden sein könnte. Ich habe darüber folgende Versuche gemacht:

a) 40 ccm. der wässrigen Lösung des Invertinpräparates I, welche etwas weniger als 0,4 g Substanz entsprachen,<sup>2)</sup> wurden eingedampft, mit Soda + Salpeter geschmolzen, die Schmelze in verdünnter Salpetersäure gelöst, durch Eindampfen von salpetriger Säure befreit, dann mit Ammoniak alkalisirt und bis zum nächsten Tag stehen gelassen, dann wurde von dem entstandenen Niederschlag abfiltrirt, mit  $\text{NH}_3$ -haltigem Wasser nachgewaschen, aus dem Filtrat der grösste Theil des  $\text{NH}_3$  durch Eindampfen entfernt, mit Salpetersäure angesäuert, mit Ammoniummolybdat gefällt u. s. w. Es wurden 0,0284 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  erhalten, entsprechend — für 0,4 g Substanz — einem P-Gehalt von 1,98%. Diesen Phosphor kann man als organisch gebunden betrachten, wenn man von der im Wesentlichen sicher richtigen Annahme ausgeht, dass die Asche soviel Calcium, bezw. Magnesium enthält, dass diese Basen zur Bindung der präformirt vorhandenen Phosphorsäure ausreichen.

b) Die aus dem Invertin II durch Alkoholbehandlung erhaltene Fraction II, deren Gewicht allerdings nur 0,0888 g betrug, wurde in Wasser gelöst. Die Lösung erfolgt leicht und klar. Die etwas gelblich gefärbte Lösung wurde mit

---

1) Ausserdem enthält die Asche nicht ganz unerheblich Calciumsulfat, welches beim Behandeln der Asche mit Salzsäure in der Kälte ungelöst zurückbleibt.

2) Bei der Auflösung (siehe S. 315) blieben Eiweissflocken ungelöst, deren Quantität nicht bestimmt ist.

ein opalescentes Aussehen annahm. Nach 24 Stunden hatte sich  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  krystallinisch ausgeschieden. Es wurde erhalten 0,0118 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  (entsprechend einem P-Gehalt von 3,68%), das Filtrat wurde eingedampft, mit Soda + Salpeter geschmolzen u. s. w. Nach der Molybdänmethode wurde erhalten 0,0030 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,94\%$  P. Diesen Phosphor wird man mit höchster Wahrscheinlichkeit als gebundenen ansehen müssen, er ist allerdings sehr gering, aber man wird auch mit der Möglichkeit rechnen müssen, dass in der ersten stark ammoniakalischen Lösung eine Abspaltung von Orthophosphorsäure stattgefunden haben kann, die zuerst ausgeschiedenen 0,0118 g  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  also nicht vollständig auf präformirte Phosphorsäure zu beziehen sind.

c) Der aus der Eisessiglösung des Invertinpräparates III durch Alkohol- und Aetherzusatz erhaltene, mit Alkoholäthergemisch, dann mit Aether gewaschene Niederschlag wurde auf einem gewogenen Filter gesammelt und bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Sein Gewicht betrug 0,1016 g. Derselbe wurde mit Soda + Salpeter verbrannt, was allerdings nicht vollkommen exact durchzuführen war, da der Niederschlag sammt dem Filter (Schleicher und Schüll aschefrei Nr. 590) verbrannt werden musste. In der Lösung der Schmelze wurde die Phosphorsäure nach vorgängiger Fällung mit Ammonmolybdat wie gewöhnlich bestimmt. Erhalten 0,0320 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Daraus berechnet sich der Gehalt des Präparates an P zu 8,80% (20,15%  $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Da die Substanz noch Kalk und Magnesia enthalten haben konnte, wurden diese im Filtrat von der Molybdänfällung bestimmt. Zu dem Zweck wurde dasselbe mit  $\text{NH}_3$  alkalisirt und mit Ammonoxalat versetzt; der ausgeschiedene oxalsäure Kalk nach 24 Stunden abfiltrirt. Es wurden erhalten 0,0014 g CaO. Im Filtrat + Waschwasser wurde Magnesium bestimmt. Zu dem Zweck wurde dasselbe auf dem Wasserbad bei Erhaltung der ammoniakalischen Reaction auf etwa  $\frac{1}{4}$  eingedampft, dann noch etwas  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hinzugefügt, nach 20stündigem Stehen das ausgeschiedene  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  abfiltrirt etc. Erhalten 0,0046 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ .

Nimmt man an, dass die Molybdänlösung ganz frei von Ca und Mg war, ferner, dass diese in der Substanz vollständig als Phosphate vorhanden waren, so wäre eine dementsprechende Quantität  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  von der gefundenen abzugiehen. Der erhaltene Kalk entspricht 0,0028 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ . Es sind also  $0,0028 + 0,0046 = 0,0074$  g von den oben erhaltenen 0,0320 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  abzugiehen, das ergibt 0,0246 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  als ganz sicher aus organischem Phosphor stammend = 6,77% P (= 15,48%  $\text{P}_2\text{O}_5$ ). Dieser Werth ist als der Minimalwerth anzusehen.

Ich kann diese Mittheilungen nicht schliessen, ohne meine Ansichten über die Chancen auszusprechen, welche der Versuch, das invertirende Ferment oder Enzym selbst, also nach der jetzt gebräuchlich werdenden Nomenclatur die Saccharase oder Sucrase,<sup>1)</sup> zu isoliren, bietet. So lange man nur ein lösliches Enzym der Hefe kannte, nämlich das Invertin, wie es zur Zeit der auf meine Veranlassung unternommenen Versuche von Barth der Fall war, waren die Versuche, das Enzym zu isoliren, durchaus berechtigt. Die Sachlage hat sich aber seitdem ausserordentlich zu Ungunsten der Lösbarkeit der Aufgabe verschoben. Bei meinen Versuchen über die Autodigestion der Hefe habe ich drei bisher unbekannte Enzyme in der Hefe aufgefunden:<sup>2)</sup> 1. ein eiweissspaltendes, welches in seiner Wirkung dem Trypsin sehr nahe steht, jedoch mit dem Unterschied, dass es noch energischer spaltend zu wirken scheint, da die digerirte Flüssigkeit nichts Wesentliches von Albumosen oder Pepton enthält. M. Hahn und Geret<sup>3)</sup> haben dasselbe kürzlich aus Hefepresssaft isolirt und festgestellt, dass es sich von dem Trypsin dadurch unterscheidet, dass es am besten bei saurer Reaction wirkt.

F. Kutscher ist freilich, wie ich aus einem mir freund-

---

1) Oppenheimer, Die Fermente, 1900, S. 202.

2) Centralblatt f. d. med. Wissensch., 1889, Nr. 13. — Diese Zeitschrift, Bd. XIII, S. 506. — Zeitschr. f. klin. Med., Suppl. zu Bd. 17, S. 77, 1890.

3) Zeitschr. f. Biol., Bd. 40, S. 117 u. ff.

nebst übersandten Separatabdruck aus den Sitzungsberichten der Gesellschaft etc. zu Marburg, 1900, Nr. 5, Juni, über einen am 20. Juni 1900 gehaltenen Vortrag ersehe, bezüglich meines Antheils an der Auffindung des proteolytischen Enzyms der Hefe wesentlich anderer Ansicht. Er sagt l. c. S. 70: «Die ersten Angaben, welche auf das Vorhandensein starker proteolytischer Enzyme im Innern der Hefe hinweisen, verdanken wir Schützenberger (Bull. de la soc. chimique de Paris T. 21, 1874, S. 194 u. 204, weiter «die Gährungserscheinungen» 1876) und Kossel (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 294 und Bd. VII, S. 14). Die beiden genannten Forscher überliessen gewaschene Hefe der Selbstgährung bei 37—40° und konnten danach eine starke Zunahme der wasserlöslichen Substanz feststellen. Unter denselben fanden sie in reichlicher Menge Tyrosin, Leucin, freie Alloxurbasen und freie Phosphorsäure. Es sind das lauter Substanzen, die nur aus zersetzten Nucleinen und Eiweisskörpern der Hefe stammen konnten. Die folgenden Arbeiten von Salkowski (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIII, S. 506 und Zeitschr. f. klin. Md., Bd. 17, Suppl.) und Hahn (Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 31, S. 200 u. 2333) haben über die Natur des proteolytischen Enzyms in der Hefe und den Abbau, den die Eiweisskörper durch dasselbe erfahren, nichts wesentlich Neues ergeben.»

Demgegenüber sehe ich das wesentlich Neue in meinen Arbeiten in dem von mir gelieferten Nachweis, dass die Eiweisspaltung auf der Wirkung eines in der Hefezelle vorhandenen, bei Abtödtung desselben freiwerdenden, löslichen Enzyms beruht. Diesen Nachweis kann ich an der von Kutscher citirten Stelle nicht finden.

In der ersten Arbeit von Kossel,<sup>1)</sup> welche Kutscher citirt, findet sich, und zwar auf S. 294, nur ein kurzer Hinweis auf Schützenberger. Es heisst daselbst:

«Ich glaube nach den mitgetheilten Resultaten das Nuclein als die Quelle der Xanthinkörper bezeichnen zu dürfen, die nach den Untersuchungen von Schützenberger bei der

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. IV, S. 290.

Selbstgährung der Hefe auftreten. Daneben erfolgt bei dieser Selbstgährung eine Abgabe von Phosphorsäure.»

In der zweiten citirten Arbeit von Kossel<sup>1)</sup> heisst es l. c. S. 14:

«Diese Versuche geben freilich noch keinen Aufschluss darüber, ob überhaupt in den Geweben solcher Organismen, welche gezwungen sind, von ihrer eigenen Körpersubstanz zu leben (im Orig. nicht gesperrt S.), eine Zersetzung von Nuclein stattfindet. Für die Entscheidung dieser Frage dienten Versuche an Hefe.

Lässt man Hefe mit Wasser einige Stunden bei warmer Temperatur stehen, so tritt bekanntlich Kohlensäureentwicklung auf, das Wasser wird sauer, enthält bald Phosphorsäure, Leucin, Tyrosin, Hypoxanthin u. s. w. — genug, es zeigen sich chemische Vorgänge ohne gleichzeitige Aufnahme von Nahrungstoff.»

Aus dem citirten Wortlaut geht hervor, dass Kossel seine Versuche in einer ganz anderen Absicht und unter ganz anderen Bedingungen angestellt hat. Es ist ja möglich, dass auch unter diesen Bedingungen das eiweissspaltende Enzym mitwirkt, aber diese Frage wird hier garnicht berührt, da ja ausdrücklich von Lebensvorgängen gesprochen wird und über etwaige Enzyme mikroskopischer Organismen unter diesen Bedingungen, d. h. wenn sie leben, natürlich nichts festgestellt werden kann. Die Versuche Kossel's berühren also die vorliegende Frage nicht, und es ist mir unverständlich, wie Kutscher sie in diesem Zusammenhang citiren kann.

Was Schützenberger betrifft, so habe ich bisher angenommen, dass auch seine Angaben sich nur auf die sogenannte Selbstgährung beziehen. Das ist die allgemeine Annahme, und auch Kutscher spricht nur von dieser. In der Arbeit von M. Hahn und Geret findet sich nun aber erwähnt, dass Schützenberger auch Beobachtungen an mit kreosothaltigem Wasser übergossener Hefe angestellt und bei dieser eine beträchtliche Verarmung der zurückbleibenden Hefe an Stickstoff festgestellt habe. Bei diesen Versuchen, die

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. VII, S. 7.



mir bisher unbekannt geblieben waren, handelt es sich höchstwahrscheinlich um die Wirkung eines eiweisspaltenden Enzyms. Es ist natürlich irrelevant, ob mir dieser Versuch bekannt war oder nicht, ich kann für mich, vorausgesetzt, dass in diesen Versuchen von Schützenberger die Hefe sicher abgetödtet und Bakterienwirkung ausgeschlossen war, nur noch in Anspruch nehmen, die richtige Deutung für den Vorgang gegeben zu haben. Diese Versuche hat aber Kutscher sicher nicht im Auge gehabt, denn er spricht nur von Selbstgährung, und dass diese nicht die Existenz eines eiweisspaltenden Enzyms beweist, liegt auf der Hand.

Bezüglich der Wirkungen des Enzyms der Hefe habe ich festgestellt, was nach dem damaligen Stand unserer Kenntnisse über die Constitution des Eiweisses festzustellen war, wenn ich auch zugeben muss, dass schon damals einige Ergänzungen, namentlich in Bezug auf Peptonbildung, möglich und wünschenswerth gewesen wären.

Kutscher selbst hat, wie ich, Versuche über die Selbstverdauung der Hefe unter Anwendung von Chloroformwasser angestellt, mich jedoch nicht als Autor des Verfahrens erwähnt. Nun beanspruche ich ja nicht, jedesmal genannt zu werden, wenn Jemand dieses in allgemeiner Anwendung stehende, von mir herrührende Verfahren benutzt, wohl aber ist das erforderlich, wenn ohne das unvermeidlich Missverständnisse entstehen. Wenn Kutscher z. B. sagt: «Dass die von mir benutzte Methode einer ausgedehnten Anwendung fähig ist, um uns über die intracellulären Enzyme der Mikroorganismen zu unterrichten, ist klar. Sobald sie sich, wie die Hefe, in Massenculturen gewinnen und auswaschen lassen, muss ihre Selbstverdauung uns eine schnelle Antwort auf die Frage nach dem Vorhandensein proteolytischer, intracellulärer Enzyme und deren Natur geben,» so wird wohl Niemand auf die Vermuthung kommen, dass diese von Kutscher benutzte «Methode», von welcher er rühmt, dass sie einer ausgedehnten Anwendung fähig sei, nichts Anderes ist, als das von mir angegebene und zuerst an demselben Object angewendete, seitdem vielfach zur Auffindung von Enzymen und zum Studium der Spaltungsvorgänge benutzte Verfahren

der Digestion mit Chloroformwasser, vielmehr muss Jeder glauben, dass es sich um eine neue, von Kutscher aufgefundene Methode handelt.

Die Ausdrucksweise von Kutscher ist, meines Erachtens nach, darum besonders unglücklich gewählt, weil Kutscher nicht versäumt hat, mich zu citiren, wo er glaubt, eine abfällige Kritik an mir üben zu können. Dadurch kann der Eindruck entstehen, als ob Kutscher mich absichtlich nicht als Autor für die Chloroformwasser-Digestion nennt, weil sonst seine Untersuchungen als das erscheinen würden, wofür ich sie ansehe, nämlich als weiterer Ausbau älterer, hauptsächlich meiner Versuche, welcher erforderlich war, seitdem wir durch Kossel neue Anschauungen über die Constitution des Eiweisses gewonnen haben. Dass man mit diesem Verfahren auch Mikroorganismen auf Enzyme wird untersuchen können, wenn dieselben als Massenculturen vorhanden sind, ist allerdings klar, so klar und selbstverständlich, dass es eigentlich gar nicht erst gesagt zu werden brauchte.

Das zweite Enzym der Hefe, das aber möglicher Weise mit dem eiweiss-spaltenden identisch ist, ist das nuclein-spaltende, das dritte, das Enzym, welches aus den Kohlehydraten der Hefe Zucker bildet, und zwar, wie ich jetzt sagen kann, nicht aus dem Gummi, sondern aus den anderen Kohlehydraten der Hefe, sei es nun nur aus dem «Hefenglycogen», sei es auch aus der Cellulose. Möglicher Weise ist noch ein weiteres Ferment vorhanden, welches auf die sogenannten störenden Substanzen (d. h. die die Ausfällung der Xanthinbasen durch Silbersalze störenden) zerstörend wirkt. Sodann ist von Emil Fischer<sup>1)</sup> die Maltase (oder Glucose) in der Hefe aufgefunden. Endlich führen Hahn und Geret auch das Vorhandensein einer Oxydase an. Dabei ist der Zymase noch garnicht gedacht. Dass diese Fülle von Fermenten die Isolirung eines einzelnen fast aussichtslos erscheinen lässt, braucht kaum hervorgehoben zu werden.

---

<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XXVIII, S. 1433. (1895).

Wir beurtheilen die Gegenwart oder Abwesenheit eines Enzyms nach seiner Wirkung, weil wir ein anderes Kriterium hierfür nicht haben.

Bei der Darstellung eines Enzyms reicht dieses Kriterium aber dann nicht mehr aus, wenn die Möglichkeit besteht, dass ein zweites oder drittes Enzym in unwirksam gewordenem Zustand vorhanden sein könnte. Ein durch Erhitzen oder sonstwie seiner specifischen Energie beraubtes, unwirksam gewordenes Enzympräparat hat, soweit wir wissen, dieselbe elementare Zusammensetzung, wie das wirksame, eine Enzymlösung zeigt, wenn sie durch Aufkochen oder auf einem anderen Wege unwirksam gemacht ist, dasselbe Verhalten zu Reagentien, wie vorher. Es ist nicht daran zu zweifeln, oder doch höchst wahrscheinlich, dass bei dem Uebergang eines Enzyms in die unwirksame Form intramolekulare Umlagerungen, Atomwanderungen im Molekül vor sich gehen, dass also auch chemisch ein wirksames Enzym ein anderer Körper ist, wie ein unwirksames, aber unsere Hilfsmittel sind zu grob, um diese Umwandlung auf einem anderen Wege als durch die Abnahme oder das Verschwinden der specifischen Wirksamkeit nachweisen zu können, namentlich ändern sich die Löslichkeitsverhältnisse nicht. Wenn man also ein Material bearbeitet, welches mehrere Enzyme enthält, so kann man nicht wissen, ob die Auszüge nicht mehrere Enzyme enthalten. Das ist auch dann nicht ausgeschlossen, wenn die Prüfung auf dieselben negative Resultate ergibt. Es ist ja wohl denkbar, dass es unter Umständen einmal möglich sein könnte, Fermente zu trennen, es liegen ja auch Versuche nach dieser Richtung hin vor, im Allgemeinen aber ist, wenn man aus einem mehrere Enzyme enthaltenden Material ein Enzym dargestellt zu haben glaubt, immer mit der Möglichkeit zu rechnen, dass diesen Enzymen andere in unwirksamer Form beigemischt sein können.

---

## Ueber die eiweissfällende Wirkung des Chloroforms.

Von  
**E. Salkowski.**

---

(Aus dem chem. Laboratorium des pathol. Instituts zu Berlin.)  
(Der Redaction zugegangen am 3. November 1900.)

---

Die Mittheilung von Formánek «Ueber die Einwirkung von Chloroform und Chloralhydrat auf den Blutfarbstoff» in Heft 4 und 5, Bd. XXIX dieser Zeitschrift, welche sich nicht allein auf den Blutfarbstoff, sondern auch auf Blut, Blutserum und Eiweiss bezieht, veranlasst mich, auch meinerseits einige einschlägige Beobachtungen mitzutheilen.

Bei meiner vielfachen Beschäftigung mit dem Chloroform in seiner Anwendung als Conservierungsmittel hat mir natürlich die eigenthümliche, unter gewissen Bedingungen auftretende, coagulirende Wirkung des Chloroforms nicht entgehen können.

In meiner Mittheilung über die antiseptische Wirkung des Chloroformwassers aus dem Jahre 1888<sup>1)</sup> habe ich bereits erwähnt, dass sich Blut nicht mit Chloroform conserviren lasse, weil es allmählich zu einer dicken Masse geseht. Horbaczewski und Formánek haben diese Angabe augenscheinlich nicht gekannt, woraus ich den genannten Autoren natürlich keinen Vorwurf machen will, um so weniger, als meine Angabe zwar in den Maly'schen Jahresbericht für 1888 übergegangen (S. 355), aber schwer zu finden ist.

Im Interesse anderer Versuche, deren Veröffentlichung ich noch verschiebe, habe ich auch versucht, wie sich mit Chloroform durchgeschütteltes, in Glasstöpselgefässen befind-

---

1) Deutsche med. Wochenschr., 1888, Nr. 16.

neues Blut bei der Aufbewahrung im Thermostaten bei 10° verhält. Es ergab sich dabei, dass das Blut stets nach längerer oder kürzerer Zeit, etwa 24—48 Stunden, zu einer dicklichen Masse gesteht, die meistens ganz compact ist, abgesehen von einer kleinen Quantität blutig gefärbter Flüssigkeit, welche beim Neigen des Glases an der Oberfläche der compacten Masse herabrinnt. Schüttelt man durch und filtrirt an der Saugpumpe, so zeigt sich das Filtrat mitunter nur schwach röthlich gefärbt, meistens aber ziemlich stark blutfarbstoffhaltig, in jedem Fall aber war es stark eiweisshaltig. Es gelang also nicht, das Eiweiss auf diesem Wege zu entfernen. Nach der Publication von Formánek überzeugte ich mich, dass schon kurz dauern- des Erwärmen auf 55° genügt, um das mit Chloroform ver- setzte Blut in eine solche durch geronnenes Eiweiss dickliche Masse umzuwandeln. Das Filtrat fand ich gleichfalls blutfarb- stoffhaltig, indessen will ich damit nicht bezweifeln, dass es unter Umständen gelingen mag, den Blutfarbstoff vollständig zu entfernen. Das — von dem im Thermostaten aufbewahrten Blut — abfiltrirte Eiweiss ist in Wasser und Salzlösungen un- löslich und verhält sich ganz so, wie ein durch Erhitzung von verdünntem Blut erhaltenes Coagulum.

Was die Einwirkung des Chloroforms auf Blutserum betrifft, so möchte ich constatiren, dass genuines Blutserum, welches man behufs Conservirung mit Chloroform durchge- schüttelt hat, auch bei jahrelangem Aufbewahren bei Zimmer- temperatur nicht gerinnt und ebensowenig seröse Flüssigkeiten. Damit steht die Angabe von Formánek, dass chloroform- haltiges Blutserum bei alkalischer Reaction bei 50—55° nicht gefällt wird, im Einklang, da unter alkalischer Reaction ver- muthlich die genuine alkalische Reaction zu verstehen ist. Indessen bleibt das Chloroform doch nicht ohne Einfluss auf die Eiweisslösung: das mit Chloroform conservirte Blutserum nimmt regelmässig ein eigenthümlich opakes Aussehen an, wenn es auch im durchfallenden Licht durchsichtig bleibt. Noch stärker ist oft die Veränderung des Aussehens conser- virter seröser (pathologischer) Flüssigkeiten. In solchen kommt es auch mitunter zur Ausscheidung von ein wenig geronnenem

Eiweiss am Boden der Flasche. Diese Veränderung ist auch Anderen aufgefallen. So erwähnt Hammarsten<sup>1)</sup> von einer durch Chloroform conservirten Ascitesflüssigkeit, welche bei der Entleerung gelblich und fast klar war, dass sie nach etwa 2 Monaten dauernder Aufbewahrung ein fast milchweisses Aussehen angenommen hatte.

Friedenthal und Lewandowsky<sup>2)</sup> haben gefunden, dass Blutserum, auf 55—60° erhitzt, ein eigenthümlich opakes Aussehen zeigt und dass solches Blutserum seine Eigenschaft, auf ein Thier einer andern Species (als die, von welcher das Blutserum stammt) giftig zu wirken, verloren hat. Es wäre von Interesse, zu versuchen, ob das durch Chloroform veränderte Blutserum gleichfalls nicht mehr giftig wirkt.

Die coagulirende Wirkung des Chloroforms auf Eiweiss ist von grossem Interesse: sie steht, ebenso wie die Wirkung auf den Blutfarbstoff, welcher dabei nach Formánek nicht oder jedenfalls nicht wesentlich verändert wird — abgesehen davon, dass er seine Löslichkeit einbüsst — soviel ich sehen kann, ohne Analogie da, wenn man in Erwägung zieht, dass das Chloroform schon in sehr kleinen Mengen wirkt, dass es eine fast ganz indifferente Substanz ist, und dass das aus Blut erhaltene Coagulum sich Lösungsmitteln gegenüber anscheinend ganz ebenso verhält, wie durch Erhitzung entstandenes. Die Möglichkeit, dass durch eine genauere Untersuchung Unterschiede aufgefunden werden könnten, muss allerdings offen gelassen werden.

Bezüglich der Eiweisskörper des Eialbumens ver füge ich nur über Beobachtungen an mit Wasser (in dem Verhältniss von 1 zu 2 bis 3 Wasser) versetztem, durch Chloroform conservirtem Albumen des Hühnereiweisses. Derartiges verdünntes Albumen gerinnt beim Aufbewahren nicht, wird jedoch stark opak. Mit Chloroformwasser vermischter Eidotter gesteht allmählich zu einem Brei. Das Filtrat der behufs Filtration mit Chloroformwasser verdünnten Masse ist ganz klar — die Filtration erfolgt sehr langsam —, schwach

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 220.

2) Berl. klin. Wochenschr., 1899, Nr. 12.

jahrelangem Stehen etwas Eiweiss, welches beim Erhitzen auscoagulirt. Die auf dem Filter bleibende Masse gibt an Aetheralkohol Fett und Lecithin ab, der mit Aetheralkohol erschöpfte Rückstand erweist sich stark P-haltig. Die betreffende Flasche trug das Datum 23. 11. 1888; die lange Haltbarkeit des Lecithins — wenn man dasselbe nach dem P-Gehalt des Aetherauszugs annehmen kann — und des Vitellins ist jedenfalls bemerkenswerth.

Nicht ohne Interesse erscheint mir, dass auch aus Pepsinverdauung stammende Albumoselösungen, wenn sie mit Chloroform conservirt aufbewahrt werden, unter Umständen gewissermaassen gerinnen. Ich machte diese Beobachtung zufällig gelegentlich meiner Untersuchungen über das Peptotoxin<sup>1)</sup> an einer aus käuflichem Serumalbumin erhaltenen «Pepton»-Lösung. Es handelt sich um den Versuch XLII<sup>2)</sup> der genannten Abhandlung. Die Albumoselösung war, was ich hier wohl wiederholen darf, folgendermaassen dargestellt.

100 g käufliches Serumalbumin wurden in 2 Liter warmen Wassers gelöst. Die Lösung erfolgte leicht und fast vollständig, jedoch nicht ganz klar. Die Lösung wurde unter sorgfältiger Neutralisirung mit Salzsäure durch Erhitzen auscoagulirt, das Coagulum mit heissem Wasser gut ausgewaschen, abgepresst, mit 3 Liter künstlichem Magensaft 24 Stunden digerirt, dann mit Natriumcarbonat neutralisirt, zum Sieden erhitzt, vom ausgeschiedenen coagulirten Eiweiss abfiltrirt, das Filtrat zuerst auf freiem Feuer, dann auf dem Wasserbad zum Syrup eingedampft, dieser mit Alkohol gefällt, die Fällung abfiltrirt, mit Alkohol nachgewaschen und bei gewöhnlicher Temperatur trocknen gelassen. Die Fällung wurde dann in Wasser gelöst, die Lösung<sup>3)</sup> — das Volumen betrug ca. 200 ccm.

---

1) Virchow's Archiv, Bd. 124, S. 409.

2) Derselbe ist in Folge eines Druckfehlers in der Arbeit als LXII bezeichnet.

3) Vermuthlich ist dieselbe noch einmal filtrirt, doch finde ich hierüber nichts notirt.

— in eine Flasche gegossen, mit Chloroform durchgeschüttelt und gut verschlossen bei Seite gestellt. Nach einiger Zeit (genaue Angaben kann ich nicht machen, da ich die betreffende Flasche erst nach Monaten zufällig wiedersah) hatte sich die Flüssigkeit in einen Brei verwandelt, der sich allmählich in eine compacte Masse und eine darüber stehende gelbliche Flüssigkeit trennte. Eine weitere Untersuchung fand damals nicht statt, die Flasche wurde jedoch für eine spätere gelegentliche Untersuchung aufbewahrt.

Zur Untersuchung wurde zunächst, um die Masse filtrirbar zu machen, etwa das halbe Volumen Chloroformwasser hinzugesetzt, durchgeschüttelt, dann ein Theil des dünnen Breis auf einer Nutsche abgesaugt und mit Wasser nachgewaschen, das Waschwasser jedoch nicht mit dem Filtrat vereinigt, sondern beseitigt.

In dem beim Filtriren erhaltenen, gut ausgewaschenen Rückstand war Dysalbumose, eventuell auch Globulin zu vermuthen.

Ein Theil des Rückstandes, welcher sich beim Erhitzen mit Wasser zum Sieden nicht merklich löste, wurde 24 Stunden unter vielfachem Schütteln mit 5%iger Kochsalzlösung behandelt, wobei keine merkliche Lösung eintrat, dann filtrirt. Das leicht gelblich gefärbte, neutral reagirende Filtrat blieb beim Erhitzen klar, auch bei Zusatz von Essigsäure; bei nachträglichem Zusatz von ein wenig concentrirter Kochsalzlösung trat indessen eine gleichmässige Trübung ein, welche sich bei nochmaligem Erhitzen zum Sieden nicht änderte. Damit ist die Gegenwart einer kleinen Menge von in Wasser unlöslichem, in 5%iger Kochsalzlösung löslichem Eiweiss nachgewiesen, welches man wohl als Globulin ansehen kann.

Eine grössere Quantität des in Rede stehenden Rückstandes wurde in Wasser suspendirt und etwas Natriumcarbonatlösung hinzugesetzt. Die Substanz quoll zuerst gallertig auf, löste sich dann allmählich innerhalb 24 Stunden vollständig ohne Rückstand. Aus der Lösung fiel bei genauem Neutralisiren mit Essigsäure eine geringe Quantität eines Eiweisskörpers aus, wohl dem Gehalt an Globulin ent-



sprechend,<sup>1)</sup> von welchem abfiltrirt wurde. Das Filtrat gab beim Erhitzen zum Sieden nochmals eine geringe Eiweissausscheidung, von welcher abermals abfiltrirt wurde. Das abgekühlte, neutrale Filtrat zeigt folgendes Verhalten zu Reagentien:

1. Zusatz etwa des gleichen Volumens gesättigter Kochsalzlösung: starke Trübung, welche sich beim Erwärmen, von einer geringen, bleibenden Trübung abgesehen, löst, beim Erkalten wieder erscheint.

2. Zusatz von Salpetersäure: Niederschlag, welcher sich im Ueberschuss von Salpetersäure löst; die Lösung wird schnell gelb, auf Zusatz von Natronlauge tief orange.

3. Kupfersulfatlösung: sofort starke Fällung.

4. Essigsäure + Ferrocyankalium: starke Fällung.

Die Reactionen sind die der primären Albumosen, man muss also annehmen, dass die Heteroalbumose beim Stehen der mit Chloroform gesättigten Lösung in Dysalbumose übergegangen ist.

Es ist nun sehr bemerkenswerth, dass die nicht durch Chloroform ausgefällt, in Lösung gebliebenen Albumosen im Allgemeinen den Charakter der secundären Albumosen trugen, das Chloroform also eine Trennung bewirkt hatte.

Das gelblich gefärbte, auf empfindliches Lackmuspapier völlig neutral reagirende Filtrat von der Dysalbumose war völlig frei von in der Hitze coagulirenden Eiweisskörpern (auch bei Zusatz von Essigsäure + Kochsalz); beim Auflösen von Chlornatrium im Ueberschuss, unter Erwärmen zur Beförderung der Lösung, war keine Trübung zu bemerken, man hätte also danach primäre Albumosen ausschliessen können, dennoch war eine kleine Quantität primärer Albumose vorhanden. Als nämlich die mit Salz gesättigte, erkaltete, ganz klare Lösung von dem überschüssigen Kochsalz abgegossen und das Koch-

---

1) Nach Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie, 2. Aufl., S. 231, fällt übrigens auch die Dysalbumose beim Neutralisiren der alkalischen Lösung zum Theil wieder aus; hier fand dies, wenn überhaupt, nur in sehr unbedeutendem Grade statt.

salz in Wasser gelöst wurde, war die Lösung ein wenig trüb und klärte sich beim Erhitzen. Das Chlornatrium hatte also die Albumose mit niedergezogen. Dem entsprach auch das Verhalten zu Ammonsulfatlösung.

Eine grössere Quantität des Filtrates von der Dysalbumose wurde mit dem gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt, der entstehende Niederschlag abfiltrirt: Fraction I. Das Filtrat wurde mit Ammonsulfat in Substanz völlig gesättigt. Niederschlag: Fraction II.

Beide Fractionen wurden mit halbgesättigter bzw. gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen, dann vor der Lösung in Wasser behufs Anstellung der Reactionen schnell oberflächlich mit Wasser abgespült, um die Quantität des anhängenden Ammonsulfats möglichst zu verringern.

Die Lösung aus Fraction I gab ziemlich reichliche Fällung beim Eintragen von Kochsalz (wurde jedoch bei Sättigen damit bei Weitem nicht völlig ausgefällt), ebenso mit Salpetersäure + Kochsalzlösung und mit Essigsäure + Ferrocyankalium. Danach würde dieselbe wenigstens zu einem Theil aus primärer Albumose bestehen; abweichend davon war aber das Verhalten zu Kupfersulfatlösung: bei Zusatz derselben entstand erst sehr allmählich eine geringe Trübung resp. Fällung.

Die Lösung von Fraction II gab keine Fällung beim Eintragen von Kochsalz, auch nicht mit Salpetersäure unter Kochsalzzusatz, blieb mit Kupfersulfat auch bei längerem Stehen völlig klar, dagegen gab sie Fällung mit Essigsäure + Ferrocyankalium. Während alle anderen Reactionen die Fraction II als zu den secundären Albumosen zugehörig charakterisiren, würde sie nach dem Verhalten zu Essigsäure + Ferrocyankalium zu den primären gehören oder wenigstens solche enthalten.

Die Abweichungen in dem Verhalten dieser Albumosen von dem, was für andere Eiweisskörper festgestellt ist, mögen in dem Ausgangsmaterial begründet sein; ich habe diese Frage nicht weiter verfolgt, es genügte mir, festgestellt zu haben, dass das Chloroform eine Trennung der in der Verdauungslösung vorhandenen Albumosen bewirkt hat, insofern, als die

ausgefallene Albumose zweifellos primäre war, und zwar Dysalbumose, die in Lösung gebliebenen anscheinend ein Gemisch von Protalbumose mit Deuteroalbumosen, unter starkem Ueberwiegen der letzteren.

Endlich sei noch erwähnt, dass aus mit Chloroform conservirter Milch sich beim Stehen das Casein allmählich vollständig ausscheidet, indem es zugleich das Fett vollständig mitreisst. Die über dem Casein stehende, gelbliche, neutral reagirende Flüssigkeit ist völlig frei von Casein, enthält dagegen unverändertes Lactalbumin, welches beim Erhitzen auscoagulirt.

Es scheint mir sehr bemerkenswerth, dass die beiden untersuchten Milchproben, trotzdem sie 13 Jahre lang aufbewahrt waren — eine kleine Probe trug das Datum 1. Juli 1887, eine grössere von 3 Liter Milch mit 9 ccm. Chloroform das Datum 1. August 1887 — sich, abgesehen von einer gelblichen Färbung des Milchserums, ganz unzersetzt erwiesen. Sie zeigten nach dem Austreiben des Chloroforms beim Erhitzen den normalen Milchgeruch und enthielten keine Albumosen oder Pepton, wenigstens nicht sicher nachweisbar. Die Filtrate von dem auscoagulirten Albumin gaben allerdings Trübung mit Essigsäure + Ferrocyankalium und schwache Biuretreaction, letztere sowohl direkt, als nach der vorgängigen Ausfällung mit Phosphorwolframsäure, allein das findet man sehr häufig auch bei käuflicher Milch; diese zweifelhaften Spuren sind also bedeutungslos.<sup>1)</sup> Ausserdem gelang es übrigens nicht, durch Ammonsulfat Albumosen auszufällen; es entstanden zwar sehr geringe, harzige Fällungen, sie waren aber in heissem Wasser nur zum kleinsten Theil löslich, und diese Lösung gab keine Biuretreaction. Auch das Filtrat von dieser Fällung gab keine Biuretreaction, wie das eigentlich nach dem Befund bei der direkten Anstellung der Biuretreaction hätte der Fall sein müssen.

Daraus folgt, dass die Milch kein bei neutraler Reaction wirkendes proteolytisches Ferment enthält, andererseits aber

---

<sup>1)</sup> Vgl. hierüber Feinberg, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 33, Heft 5-6 1897, S. 16 des S-A.

auch, und das scheint mir von grösserer Bedeutung, dass Albumin bei noch so langer Aufbewahrung seiner Lösung keine «spontane» Zersetzung unter Bildung von Albumosen und Peptonen erleidet. Das gilt allerdings zunächst nur von Lactalbuminlösungen, darf aber wohl verallgemeinert werden. Wo sich also derartige Veränderungen bei gewöhnlicher Temperatur zeigen, hat man stets Grund, ein Enzym anzunehmen.

Ob die Caseinabscheidung etwa auf einem geringen Gehalt der Milch an Labferment beruht, bleibt noch zu untersuchen, direkt schliessen kann man es aus dem Befund nicht, denn auch aus käuflicher sterilisirter Milch scheidet sich bei längerer Aufbewahrung Casein ab.

---

# Ueber die Eiweisskörper der Kaltblütermuskeln und ihre Beziehung zur Wärrestarre.

Von

Dr. Otto v. Fürth,

Privatdocent und Assistent am physiologisch-chemischen Institut  
der Universität zu Strassburg i. E.

---

(Aus der zoologischen Station zu Neapel und aus dem physiologisch-chemischen Institut  
zu Strassburg i. E.)

(Der Redaction zugegangen am 8. November 1900.)

---

Vor einigen Jahren<sup>1)</sup> habe ich mich mit dem Studium der Muskeleiweisskörper der Wirbelthiere beschäftigt und insbesondere auch gewisse Gerinnungsbedingungen derselben in ihrer muthmasslichen Beziehung zu einigen Formen der Muskelstarre zum Gegenstande einer Untersuchung gemacht.

Ein Aufenthalt an der zoologischen Station zu Neapel bot mir die Möglichkeit, diese Untersuchungen auf die Muskeleiweisskörper wirbelloser Thiere auszudehnen. Eine, wenn auch nur vorläufige, Orientirung nach dieser Richtung schien mir insofern nicht unerwünscht zu sein, als nur höchst spärliche Angaben über diesen Gegenstand vorlagen und die weitgehenden morphologischen Verschiedenheiten gegenüber der quergestreiften Wirbelthiermuskulatur eine Identität der chemischen Zusammensetzung von vornherein nicht erwarten liessen.

---

<sup>1)</sup> Ueber die Eiweisskörper des Muskelplasmas. Arch. f. exper. Pathol. und Pharmak. Bd. 36, S. 230—274. 1895.

Ueber die Einwirkung von Giften auf die Eiweisskörper des Muskelplasmas und ihre Beziehung zur Muskelstarre, ebenda Bd. 37, S. 388—412. 1896.

Krukenberg<sup>1)</sup> erhielt aus den Schwanz- und Scheerenmuskeln des Hummers, aus den Schliessmuskeln einiger Muscheln, sowie aus den Armmuskeln einer Cephalopodenart (*Eledone moschata*) durch Extraction mit verdünnter Kochsalzlösung «Myosin»-artige, durch Sättigung mit Kochsalz, sowie durch einen grossen Ueberschuss von Wasser fällbare Substanzen; eine nähere Charakteristik derselben wurde nicht versucht. Die wässerigen Extracte aus Muskeln dieser und einiger anderen wirbellosen Thiere begannen sich bei 37—45° zu trüben und gaben zwischen 40—55° eine Gerinnung; eine zweite Gerinnung wurde vielfach etwa zwischen 55—65° beobachtet und endlich noch regelmässig eine spärliche Gerinnung zwischen 69—80°.

## I.

Zum Gegenstande der Untersuchung wählte ich zunächst die Arm- und Mantelmuskulatur von Octopoden; für die Beschaffung des Materials bin ich Herrn Cavaliere Dr. Lo Bianco zu besonderem Danke verpflichtet.

Es sei mir gestattet, bezüglich des histologischen Charakters der Cephalopodenmuskeln eine Bemerkung vorzuschicken. Knoll<sup>2)</sup> unterscheidet bei den Cephalopoden, ebenso wie bei anderen Mollusken und den meisten Thierklassen überhaupt, protoplasmaarme, weisse und protoplasmareiche, gelblich gefärbte Muskeln; bei den Cephalopoden gehört die Muskulatur des Herzens und der Buccalmasse zu letzterer, diejenige der Arme und des Mantels zu ersterer Kategorie. «Die Muskelfasern am Arm waren zumeist lang ausgezogen, von geringem Breiten-durchmesser, in der Kerngegend etwas verbreitert; die Rindensubstanz auf dem Längs- und Querschnitt theils homogen, theils fibrillär gezeichnet, mit feiner Punktirung des Querschnitts und zu den Fasern nahezu parallelen Längsstreifen. Fast stets aber fanden sich vereinzelt oder in kleineren Gruppen breitere, deutlich schräggestreifte, auf dem

---

1) Die Gerinnungstemperaturen der Eiweisskörper in den contractilen Geweben der Thiere. Prüfung der Muskeln auf myosinartige Körper. Vergleichende physiologische Studien 1. Reihe, 2. Abtheilung, S. 2—14. 1880.

Weitere Studien zur vergleichenden Muskelchemie. Vergleichende physiologische Studien 2. Reihe, 1. Abtheilung, S. 146—147.

2) Ueber protoplasmaarme und protoplasmareiche Muskulatur. Denkschriften der K. Akad. d. Wiss. Wien, Bd. 58. 1891. S. 633—700.

Querschnitt strahlig gezeichnete Fasern in den Präparaten eingesprengt; doch war auch an diesen Fasern die Marksubstanz in der Regel auf einen dünnen Axenstrang eingeschränkt.»

Zur Extraction der Eiweisskörper bediente ich mich, ebenso wie ich es seiner Zeit bei Verarbeitung von Wirbelthiermuskeln gethan hatte, einer physiologischen Kochsalzlösung. Die Rumpf- und Armmuskulatur einer oder mehrerer grossen Exemplare von Octopus wurde fein zerhackt, mit Quarzsand unter Zusatz 0,6%iger Kochsalzlösung gut verrieben, nach Hinzufügen einiger Tropfen Toluol 6—15 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und sodann mit Hülfe einer eisernen Tincturenpresse ausgepresst. Die erhaltene milchige Flüssigkeit wurde filtrirt; im Gegensatze zum Plasma aus Wirbelthiermuskeln gelang es hier ziemlich leicht, ein fast klares, farbloses Filtrat zu erhalten.

Dieses Muskelplasma begann sich bei langsamem Erhitzen bei 42° zu trüben. Die Trübung nahm schnell zu und wurde milchig; bei 61° erfolgte Abscheidung gallertiger Gerinnsel unter Klärung der überstehenden Flüssigkeit. Das Filtrat begann sich jenseits 70° wieder zu trüben und in der Mitte der 70er Grade schied sich wieder ein nicht sehr reichlicher Niederschlag ab.

Das Muskelplasma gerann spontan beim Stehen über Nacht unter Abscheidung gallertiger, auf der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmender Platten. Eine deutliche Herabsetzung des Coagulationspunktes der im Plasma noch gelöst gebliebenen Eiweisskörper, wie sie bei theilweise geronnenen Wirbelthiermuskelplasmen sich zu finden pflegt, konnte hier nicht beobachtet werden; die Flüssigkeit begann sich im Gegentheil einige Grade später, bei 45°, zu trüben und gab bei 63° eine gallertige Gerinnung; das klare Filtrat, längere Zeit auf 55—60° erhitzt, trübte sich neuerlich.

Verdünnte Essigsäure und Salzsäure gaben in dem Muskelplasma reichliche, im Ueberschusse sehr leicht lösliche, concentrirte Mineralsäuren im Ueberschusse schwer lösliche Fällungen.

Alkohol bewirkte einen Niederschlag, der im frischen

Zustande in Wasser leicht löslich war, nach zweitägigem Verweilen unter Alkohol aber nur mehr eine geringe Menge eines bei 55—60° gerinnenden Eiweisskörpers an Wasser abgab.

Die Fällung durch Ammonsulfat begann jenseits  $\frac{1}{4}$ -Sättigung.  $\frac{1}{8}$ -Sättigung bewirkte einen reichlichen Niederschlag. Bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung fand sich eine grössere Eiweissmenge im Niederschlage, als im Filtrate. Der Niederschlag verlor über Nacht zum grössten Theile seine Löslichkeit in Wasser; die erhaltene Lösung trübte sich bei 45—50° und gab bei 55—60° eine gallertige Gerinnung.

Das bei  $\frac{1}{2}$ -Sättigung gewonnene Filtrat wurde mit Ammonsulfat in Substanz gesättigt. Der Niederschlag löste sich am nächsten Tage leicht und vollständig in Wasser. Die Lösung trübte sich bei 47° und gerann wiederum bei 55—60°. Nach Erwärmen derselben mit Natronlauge bewirkte Zusatz einer 15%igen Ammoniumchloridlösung einen voluminösen gallertigen Niederschlag; ein Verhalten, das dem Myogen im Gegensatze zum Myosin eigenthümlich ist.

Das Myogen ist nach den Erfahrungen am Säugethiermuskel durch eine Reihe von Eigenschaften anderen Eiweisskörpern gegenüber scharf charakterisirt, die seine Identificirung leicht ermöglichen. Durch eine Anzahl von Substanzen, wie Calciumchlorid, Ammoniumchlorid, Rhodanatrium, salicylsaures Natron, Coffeinsalze u. A. wird es allmählich in einen anderen Eiweisskörper, das «lösliche Myogenfibrin», übergeführt, welcher letztere ausserordentlich leicht bereits bei Zimmertemperatur in eine geronnene Modification übergeht. Der Uebergang des bei 55—60° coagulirenden Myogens in lösliches Myogenfibrin offenbart sich in auffälliger Weise durch eine Herabsetzung der Gerinnungstemperatur um ungefähr 20 Grade. Eine andere nicht minder charakteristische Eigenschaft des Myogens ist sein Verhalten gegen gewisse Fällungsmittel bei Abwesenheit von Neutralsalzen. Eine durch Diffusion salzfrei gemachte Myogenlösung wird weder von verdünnter Essigsäure, noch von Schwermetallen, wie Silbernitrat, Kupfersulfat, Eisenchlorid, Bleiacetat gefällt; auf weiteren Zusatz einer geringen Menge eines Neutralsalzes erfolgt jedoch sogleich eine voluminöse Fällung.

Auch dem globulinartigen, durch Diffusion fällbaren Myosin gegenüber macht sich der gerinnungsbefördernde Einfluss der erstgenannten Agentien, wie Calciumchlorid, Rhodannatrium u. dergl., geltend, ohne dass es jedoch vor der Gerinnung zur Bildung eines löslichen Zwischenproduktes käme.



Die gegenwärtigen Myosins in dem aus Octopusmuskeln erhaltenen Plasma konnte ausgeschlossen werden, da der durch Halbsättigung mit Ammonsulfat fällbare Eiweisskörper nicht, wie das Myosin, unterhalb 50°, sondern analog dem Myogen zwischen 55—60° coagulirte.

Zur Prüfung auf Myogen wurde ein frisch bereitetes Plasma mit dem gleichen Volumen Ammonsulfat versetzt, der Niederschlag abfiltrirt, das Filtrat durch Sättigung mit Ammonsulfat in Substanz gefällt, der Niederschlag abfiltrirt, mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und sodann in Wasser gelöst. Von der bei 55—60° coagulirenden, durch Sättigung mit Natriumchlorid oder Magnesiumsulfat nur unvollständig fällbaren Lösung wurden Proben mit dem gleichen Volumen Calciumchlorid 10%, Ammoniumchlorid 15%, Rhodannatrium 10%, salicylsaures Natron 10% und benzoesaures Coffeinnatron 5% versetzt. In keiner der Proben, und ebensowenig in den mit physiologischer Kochsalzlösung versetzten Kontrollproben, trat innerhalb 18 Stunden bei 25—30° eine Veränderung ein.

Da die Eiweisslösung nicht sehr concentrirt gewesen war und ich bei meinen früheren Versuchen die Abhängigkeit der Wirkung der gerinnungsbefördernden Agentien von dem Eiweissgehalt der angewandten Flüssigkeiten kennen gelernt hatte, wiederholte ich den Versuch mit aus Octopusmuskeln frisch bereitetem, sehr eiweissreichem Plasma. Diesmal trübte sich die mit Calciumchlorid versetzte Probe allmählich und setzte innerhalb 2 Tagen bei Zimmertemperatur ein sehr reichliches, fast die gesamte Eiweissmenge einschliessendes Gerinnsel ab, während alle anderen Proben vollständig klar blieben. Die beim Muskelplasma der Wirbelthiere beobachtete, ausserordentlich kräftige gerinnungsbefördernde Wirkung der Rhodan- und Coffeinsalze, sowie auch des salicylsauren Natrons war hier sonach gänzlich ausgeblieben.

Da ich seiner Zeit eine Reihe von Agentien, wie Blutserum, Eiereiweiss u. A. kennen gelernt hatte, die im Stande sind, die mächtige gerinnungsbefördernde Wirkung der vorerwähnten Substanzen den Muskeleiweisskörpern gegenüber

aufzuheben, und die Gegenwart ähnlicher Factoren bei meinen gegenwärtigen Versuchen nicht ohne Weiteres ausgeschlossen werden konnte, untersuchte ich das Verhalten des Octopusplasmas bei der Diffusion, um weitere Anhaltspunkte zur Identificirung der vorliegenden Proteinsubstanzen zu gewinnen.

Frisch bereitetes Octopusmuskelplasma wurde 1 Tag gegen fliessendes Wasser, sodann 1 Tag gegen destillirtes Wasser diffundirt. Der massenhafte, gelatinöse Niederschlag wurde abfiltrirt, gewaschen, sodann mit verdünnter Ammonsulfatlösung verrieben; der grösste Theil blieb ungelöst; die Flüssigkeit enthielt nur eine geringe Menge zwischen 55—60° coagulirendes Eiweiss. Die von Diffusionsniederschlag befreite, nur Spuren von Kochsalz enthaltende, klare, sehr eiweissreiche Flüssigkeit gab, im Gegensatz zu einem analog behandelten Säugethiermuskelplasma, reichliche Fällungen, sowohl mit Essigsäure als auch mit Schwermetallsalzen, mit Ausnahme des Eisenchlorids, dessen fällende Wirkung jedoch auch nach Zusatz von Natriumchlorid ausblieb. Sie gerann bei 60°.

Zur Darstellung eines Analysenpräparates wurde eine nach demselben Verfahren aus in Salzlösung conservirten<sup>1)</sup> Muskeln dargestellte Diffusionsflüssigkeit, durch tropfenweisen Zusatz von verdünnter Essigsäure gefällt. Der nach Hinzufügen des gleichen Volumens Alkohol sich gut absetzende Niederschlag wurde auf einem Rohseidefilter gesammelt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und bei 100° zur Gewichtsconstanz getrocknet. Die Analyse ergab:

$$C = 52,86\%$$

$$H = 7,12\%$$

$$N = 15,63\% \text{ (nach Dumas).}$$

Die Analysen des aus Kaninchenmuskeln dargestellten Myogens hatten als Mittelwerth ergeben:

$$C = 52,69\%$$

$$H = 6,93\%$$

$$N = 16,20\% \text{ (nach Kjeldahl).}$$

---

<sup>1)</sup> Da ein in Neapel aus frischen Octopusmuskeln dargestelltes Analysenpräparat leider während des Transportes zu Grunde ging, sah ich mich auf conservirte Muskeln angewiesen, die frisch präparirt in chemisch reine gesättigte Ammonsulfatlösung eingelegt worden waren. ..

Es handelte sich mir nun weiter darum, festzustellen, inwiefern die angegebenen Abweichungen vom Verhalten des Wirbelthiermuskelplasmas bei Wirbellosen regelmässig ange-  
troffen werden.

Ein aus Muskeln einer anderen Cephalopodenart, *Sepia officinalis*, nach analogem Verfahren dargestelltes Plasma trübte sich bei 40° und gab bereits bei 43° einen reichlichen gelatinösen Niederschlag; das Filtrat coagulirte abermals bei 45—47°. Das Sepienmuskelplasma gab mit Essigsäure eine reichliche, im Ueberschusse leicht lösliche Fällung; bei  $\frac{1}{3}$ -Sättigung mit Ammonsulfat Trübung, bei  $\frac{2}{7}$ -Sättigung einen Niederschlag. Die Prüfung der gerinnungsbefördernden Agentien in der beschriebenen Weise ergab auch hier wiederum das völlige Ausbleiben eines Effectes beim Rhodannatrium, beim salicylsauren, beim coffeinbenzoesauren Natron, während das Calciumchlorid so mächtig wirkte, dass sich am nächsten Tage die vom Gerinnsel befreite Flüssigkeit eiweissfrei erwies. Eine schwache Wirkung des Ammoniumchlorids gab sich durch das Auftreten einer Trübung zu erkennen.

Um die Untersuchung auf einen anderen Thierkreis auszudehnen, untersuchte ich weiter Holothurien (Seewalzen), deren Muskulatur mir umsomehr ein nicht uninteressantes Studienobject zu bilden schien, als diese Thiere wohl die niedrigst organisirten sein dürften, von denen zu typischen Muskeln differenzirtes contractiles Protoplasma in grösserer, zur chemischen Untersuchung ausreichender Menge erhältlich ist.

20 grosse Exemplare von *Stichopus regalis* wurden durch Einlegen in gelinde erwärmtes Chloroformwasser zur Erschlaffung gebracht, sodann aufgeschnitten, die zarten, brüchigen längsverlaufenden Muskelbündel sauber herauspräparirt, fein zerhackt und mit Quarzsand unter Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung verrieben, wobei dieselben zu einer flockigen Masse zerfielen; nach  $\frac{1}{2}$  Stunde wurde colirt und filtrirt.

Das opalescente, gelbliche, schwach alkalische Plasma trübte sich bei 47°, gerann bei 57—65°; das Filtrat gab in der Mitte der 70er Grade noch eine weitere, sehr spärliche Gerinnung. Verdünnte Essigsäure und Salzsäure gaben Fällungen, ebenso Ammoniumchlorid nach vorausgegangenem Erwärmen mit Natronlauge; bei  $\frac{3}{7}$ -Sättigung mit Ammonsulfat fiel nur ein spärlicher Niederschlag aus. Die Prüfung der gerinnungsbefördernden Agentien in der vorbeschriebenen Art ergab auch hier wiederum das Fehlen der Wirkung seitens des Rhodan-natriums, des coffeinbenzoesauren und des salicylsauren Natrons; es erfolgte weder nach 15 Stunden bei Zimmertemperatur, noch nach 6stündigem Verweilen bei 30° die Bildung eines Gerinnsels, noch konnte nach dieser Zeit eine Verschiebung des Coagulationspunktes constatirt werden, wie sie bei den Muskelplasmen der Wirbelthiere als Vorläufer der Gerinnung regelmässig beobachtet wird. Das Calciumchlorid entfaltete auch in diesem Falle eine mächtige Wirkung; eine minder kräftige, aber immerhin ausgeprägte Wirksamkeit machte sich beim Ammoniumchlorid geltend.

Nach dem beschriebenen Diffusionsverfahren wurde eine salzfreie, bei 55—60° gerinnende Flüssigkeit erhalten, die mit Schwermetallsalzen, wie Kupfersulfat, Zinkchlorid, Bleiacetat, Quecksilberchlorid und Silbernitrat, direkt reichliche Fällungen gab. Eisenchlorid dagegen gab auch nach Kochsalzzusatz auffälliger Weise hier, ebenso wenig wie beim Octopusplasma, einen Niederschlag.

Ich möchte anschliessend bemerken, dass die Muskeln der Holothurien histologisch von denjenigen der Cephalopoden verschieden sind. Nach Ludwig<sup>1)</sup> sind die Muskelfasern der Holothurien lang gestreckte, an den zugespitzten Enden verjüngte, glatte Cylinder von homogener Substanz. Quer- und Längsstreifung scheinen gänzlich zu fehlen, und dürften dahinlautende Angaben einiger Autoren auf Täuschungen beruhen, die durch Faltungen der zarten Sarcolemms hervorgerufen worden waren.

Es handelt sich also um glatte Muskulatur in des Wortes eigentlicher Bedeutung und ich möchte es nicht unterlassen, hier auf eine aus

---

<sup>1)</sup> Bronn, Klassen und Ordnungen des Thierreiches, 2. Bd., 3. Abth., 1. Buch, Seewalzen, von Hubert Ludwig, 1889—92.

deren Gegenstand die Eiweisskörper glatter Wirbelthiermuskeln bilden. Durch Extraction der Muskulatur des Schweine- oder Gänsemagens mit physiologischer Kochsalzlösung erhielt Velichi ein spontan gerinnendes Plasma, aus dem durch Dialyse ein in verdünnten Neutralsalzlösungen löslicher, durch Essigsäure fällbarer, bei 54—60° coagulirender Eiweisskörper niedergeschlagen wurde; das Filtrat enthielt einen albuminartigen, bei 46—50° gerinnenden Eiweisskörper. Eine Substanz letzterer Art vermisste ich in den Muskeln von Stichopus; dagegen sah Krukenberg die Extractionsflüssigkeit von *Holothuria tubulosa* bereits bei 45° gerinnen.

Immerhin scheint mir aus den angeführten Beobachtungen hervorzugehen, dass man keineswegs berechtigt ist, anzunehmen, dass jedem zu Muskeln differenzirten contractilen Protoplasma die gleichen Eiweisssubstanzen eigenthümlich seien; wir sehen vielmehr nicht nur bei histologisch verschiedenen, sondern auch bei morphologisch anscheinend gleichwerthigen Muskelgeweben weitgehende Abweichungen in ihrem chemischen Verhalten, deren näheres Studium von verschiedenen physiologischen Gesichtspunkten aus mir als eine nicht undankbare Aufgabe erscheint.

### III.

Anschliessend möchte ich noch einige Bemerkungen über die Wärmestarre der Kaltblütermuskeln hinzufügen. Bekanntlich wird jeder Muskel, sobald die Temperatur des umgebenden Mediums eine gewisse Grenze erreicht hat, starr und unerregbar und man ist seit Kühne's<sup>2)</sup> classischen Versuchen gewohnt, diese Erscheinungen auf die Gerinnung der Muskel-eiweisskörper zu beziehen.

Neuerdings hat Vernon<sup>3)</sup> die Wärmestarre der Muskeln von zahlreichen Kaltblütern einer sehr sorgfältigen Untersuchung unterzogen, wobei er die bei der Wärmestarre eintretenden Muskelverkürzungen graphisch verzeichnete und gleich-

---

1) J. Velichi, Zur Chemie der glatten Muskeln. Centralbl. f. Physiol., Bd. 12, S. 351—352.

2) Myologische Untersuchungen, Leipzig 1860 S. 173 ff.

3) Heat rigor in coldblooded animals. Journ. of Physiol. Bd. 24, S. 239—287, 1899.

zeitig durch elektrische Reizung jene Temperatur feststellte, bei der die Muskelerregbarkeit dauernd verloren geht. — Es ergab sich sowohl bei den willkürlichen Muskeln wirbelloser Thiere (Mollusken, Krebse, Würmer), als auch verschiedener Amphibien, Reptilien und Fische, dass der allmählich erwärmte Muskel zunächst eine bleibende Verkürzung erfährt, die sich bei den untersuchten Amphibien (Fröschen, Kröten, Axolotl, Salamander) zwischen 33—40°, bei Reptilien zwischen 38—49°, bei Wirbellosen zwischen 24—53,9° vollzieht; der Verlust der Muskelerregbarkeit wurde bei 39—48° beobachtet. Bei wirbellosen Thieren geht dieser Verkürzung regelmässig eine etwa zwischen 20 und 40° einsetzende hochgradige Erschlaffung voraus, die bereits von Schönlein<sup>1)</sup> näher studirt worden ist. Nach einem mehr oder minder deutlich markirten Temperaturintervall folgt dieser ersten Verkürzung eine zweite, meist etwa zwischen 50 und 57° beginnende Contraction. Was die Deutung dieser Erscheinungen betrifft, zweifelt Vernon nicht daran, dass die letztgenannte Verkürzung einer Eiweissgerinnung zuzuschreiben sei. Die erste Verkürzung könnte allerdings auch der Gerinnung eines Eiweisskörpers zuzuschreiben sein, doch hält Vernon dies für unwahrscheinlich, da Beobachtungen über den unter gewissen Bedingungen erfolgenden Rückgang einer solchen Verkürzung nach darauffolgender Temperaturerniedrigung vorliegen und da Vernon die intravitale Existenz eines nach Art des löslichen Myogenfibrins bereits zwischen 30 und 40° gerinnenden Eiweisskörpers nicht für erwiesen annimmt; er vermuthet daher, die initiale Verkürzung sei eher eine Art von Tetanus.

Ohne die Möglichkeit einer innerhalb der genannten Temperaturgrenzen erfolgenden tetanischen Contraction bestreiten zu wollen, glaube ich doch sagen zu müssen, dass mir, speciell beim Frosche, das intravitale Vorkommen des löslichen Myogenfibrins, das ich im Muskelplasma des Frosches nie vermisst habe, durch Kühne's Beobachtungen ausserordentlich wahrscheinlich gemacht zu sein scheint. Nach Kühne (l. c.

---

1) Zeitschr. für Biologie, Bd. 36.

40° C. getauchter Frosch-Sartorius augenblicklich starr, hart, undurchsichtig und sauer und verhielt sich dann gerade so wie ein todenstarrer Muskel. Wurden ferner lebende Frösche derart in Wasser von 40° eingebracht, dass letzteres die Beine nur bis an die Mitte der Oberschenkel umgab, so erwiesen sich die erwärmten Theile der Muskeln vollkommen starr, sauer und unerregbar; die übrigen Theile der Oberschenkelmuskeln dagegen waren kaum von normalen Muskeln zu unterscheiden. Gegenüber der Annahme von Schiff, «dass die Wärmestarre nichts Anderes als die bekannte idiomuskuläre Zusammenziehung» sei, betont Kühne, die Wärmestarre von 40° sei eine eclatante Gerinnung, umsomehr, als sie nicht nur dem schon todenstarren, sondern sogar auch dem gefaulten Muskel eigenthümlich sei. Mit der Vorstellung eines Tetanus wäre dieser Befund kaum zu vereinen; er erklärt sich aber äusserst einfach aus dem Vorhandensein eines bei 40° gerinnenden Eiweisskörpers, der sich leicht nachweisen lässt. Will man demzufolge trotzdem das intravitale Vorkommen des löslichen Myogenfibrins bestreiten, so bleibt, wie mir scheint, nur die Möglichkeit bestehen, anzunehmen, das lösliche Myogenfibrin entstehe erst im Momente der Erwärmung aus seiner Vorstufe, dem Myogen. Dem widerspricht aber meine Beobachtung, dass, zum Mindesten in vitro, von einer solchen rapiden Umwandlung des bei 55—65° coagulirenden Myogens in lösliches Myogenfibrin bei schnellem Erhitzen nichts zu bemerken ist. Während sich also bei Fröschen die Initialverkürzung innerhalb der Temperaturgrenzen der Gerinnung des löslichen Myogenfibrins abspielt, liegt der Beginn der secundären Contraction (46,8—62,5°) zweifellos innerhalb der Grenzen der Myosin- und Myogen-Gerinnung.

Bei Durchsicht der Tabellen Vernon's, welche den Verlauf der Verkürzungen einzelner Muskeln einerseits bei *Rana temporaria*, andererseits bei *Rana esculenta* verzeichnen, fiel mir auf, dass der Beginn der secundären Contraction bei der ersteren Species regelmässig um einige Grade niedriger fällt, als bei den entsprechenden Muskeln der letzteren Gattung:

	<i>Rana temporaria</i>	<i>Rana esculenta</i>
Musculus Gastrocnemius	46,8	51,6—55,5
„ Sartorius	53,3	57,8—60,0
„ Rectus abdominis	50,0	61,0—62,5
„ Hyoglossus	47,2—50,6	54,0—55,0

Bekanntlich besteht nach Schmiedeberg's<sup>1)</sup> Untersuchungen ein auffallender Unterschied zwischen den Muskeln von *Rana temporaria* und *esculenta*, insofern die charakteristische starreerregende Wirkung des Coffeins bei ersterer Gattung bedeutend mehr in den Vordergrund tritt, als bei letzterer. Da aus meinen früheren Untersuchungen hervorgeht, dass das Coffein zu jenen Substanzen gehört, die in vitro die Gerinnung des Muskelplasmas kräftig befördern, liegt es nahe, anzunehmen, dass die stärkere Wirkung des Coffein bei *Rana temporaria* in einer hochgradigeren Gerinnbarkeit des Muskeleiweißkörpers dieser Species eine einfache Begründung finde. Selbstverständlich erfordert diese Annahme eine exacte Begründung durch eine sorgfältige vergleichende Untersuchung.

Was nun weiter die Wärmestarre wirbelloser Thiere betrifft, hat Vernon den im Bereiche der ersten Verkürzung auftretenden Verlust der Muskeleerregbarkeit bei Mollusken, Krebsen und Würmern zwischen 31,5—50,5° beobachtet; die bei einer späteren Untersuchung Vernon's<sup>2)</sup> an zahlreichen Wirbellosen festgestellte Todestemperatur bewegt sich innerhalb engerer Temperaturgrenzen: 34,0—43,5°. Nach Paul Bert<sup>3)</sup> erholt sich eine junge Sepia nach 2 Minuten langem Verweilen in Seewasser von 36—37° vollständig, wenn sie in kaltes Wasser zurückgebracht wird; nach gleich langem Verweilen bei 38—39° erholt sie sich nicht mehr, doch bleiben die Muskeln noch erregbar; nach 2 Minuten bei 41—41,5°

1) Ueber die Verschiedenheit der Coffeinwirkung an *Rana temporaria* und *esculenta*. Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. II, p. 62.

2) The death-temperature of certain marine organisms. Journ. of Physiol. Bd. 25, 1899, S. 131.

3) Mémoire sur la Physiologie de la Seiche. Mémoire de la Société des Sciences de Bordeaux, T. V, S. 116, 1867.



Frenzel<sup>1)</sup> sah verschiedene Wirbellose zwischen 27—40° zu Grunde gehen.

Ich versuchte bei Exemplaren von *Octopus vulgaris* und *Eledone moschata* die Einwirkung der Wärme auf die lebende Muskulatur in der Art zu studiren, dass ich die Thiere nach Uexküll, wie andernorts geschildert,<sup>2)</sup> auf einem Gestell fixirte und ihre Kiemen mit frischem Wasser versorgte. Die Arme wurden in einem Sacke festgehalten, mit Ausnahme einer Extremität, die in einem benachbarten Gefässe mit Wasser fixirt und daselbst mit dem Wasser langsam erwärmt wurde. Man konnte so an demselben Thiere durch Erwärmen verschiedener Arme nach einander die Wirkung mehrerer Erwärmungsgrade gleichzeitig beobachten. Um 30° herum wurden die spontanen Bewegungen des Armes träge, ohne jedoch ganz zu sistiren; die Arbeit der Saugnäpfe hörte auf. Die Extremität reagierte noch auf mechanische Insulte mit schlangenartigen Windungen, wobei die Spitze des Armes in charakteristischer Weise eingerollt wurde. Ein auf 40° erwärmter Arm erschien gänzlich schlaff, bewegungs- und reactionslos; die Spitze wird nicht mehr eingerollt. Bei 43° begann bereits die Haut sich in grossen Fetzen abzuschälen. Eine deutliche Starre habe ich auch bei 46° nicht wahrgenommen. Eine unmittelbare Restitution im Laufe der nächsten Stunden nach Zurückbringen der Thiere in kaltes Wasser konnte ich auch nach Erwärmen auf nur 35° nicht bemerken. Die schlaffen Extremitäten wurden passiv nachgeschleppt. Auf längere Beobachtung musste ich verzichten, da die Thiere ihre schlaffen Extremitäten wiederholt während der Nacht selbst verzehrten.

Vergleicht man die Temperatur, bei der die Muskel-erregbarkeit verloren geht, mit derjenigen, bei welcher die beginnende Coagulation der Muskeleiweisskörper sich durch das Auftreten einer Trübung verräth (etwa 30° beim Frosche,

---

1) Temperaturmaxima für Seethiere. Pflüger's Archiv Bd. 36, 1885, S. 458.

2) Fürth, Ueber den Stoffwechsel der Cephalopoden, s. o.

40° bei der Sepia, 47° bei Stichopus, nach Krukenberg 37—45° bei verschiedenen Wirbellosen), so wird man zum Schlusse kommen müssen, dass auch die erste von Vernon beobachtete, meist weit unterhalb 50° sich vollziehende Verkürzung wenigstens zum Theile einer Gerinnung von Muskeleiweisskörpern zuzuschreiben sei. Für die zweite, meist jenseits 50° beginnende Contraction wurde dies von vornherein nicht bezweifelt.

Bezüglich der Frage, ob vielleicht eine Art Tetanus, wie ihn Vernon vermuthet, der durch Eiweissgerinnung hervorgerufenen Wärmestarre vorausgehen könne, möchte ich mich darauf beschränken, einige Schlüsse anzuführen, zu denen Gad und Heymans<sup>1)</sup> bei einer mit grosser Sorgfalt ausgeführten Untersuchung über den Einfluss der Temperatur auf die Leistungsfähigkeit der Muskelsubstanz gelangen. Seite 105 heisst es: «Es ist sehr lehrreich zu sehen, wie die Wirkungen des Muskels mehr und mehr durch Erhitzung abnehmen, beinahe bis auf Null, ohne dass eine Spur von Wärmestarre auftritt, und ohne dass das innere Gefüge des Muskels dauernd geändert wird. . . . Auf Grund dieser Erfahrungen ist man im Stande und gezwungen, die die Wärmestarre bedingenden Vorgänge weit schärfer, als es bisher geschah, in Gegensatz zu stellen nicht nur gegen die Erregungsprocesse im Muskel überhaupt, sondern auch gegen die Erregungsprocesse bei den höchsten für die Erregbarkeit noch zulässigen Temperaturen.» Ferner wird bei specieller Besprechung des Einflusses der Temperatur auf den Tetanus (Seite 89) angeführt: «Bei hohen Temperaturen büsst der Muskel ebenso sehr an Summirbarkeit, wie an Erregbarkeit ein.»

Diesen Angaben zufolge scheint mir die Vorstellung, dass ein eigentlicher Tetanus gewissermassen der unmittelbare Vorläufer der Wärmestarre sei, der Schwierigkeit zu begegnen, dass nicht etwa eine Steigerung der Muskeleerregbarkeit, sondern vielmehr eine Herabsetzung derselben bei hohen Tem-

---

<sup>1)</sup> Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiolog. Abtheilung, Supplement-Band 1890.

perischen Muskelstarre beobachtet wurde. Bekannt wurde die von Santesson<sup>1)</sup> beim Studium gewisser Formen chemischer Muskelstarre entwickelte Vorstellung, die Starre entstehe dadurch, dass die für die Contraction charakteristischen Veränderungen von dem durch das Gift veränderten Muskelgewebe nicht mehr rückgebildet werden können und so zuletzt fixirt werden, zu einer Lösung des scheinbaren Widerspruches führen und in entsprechender Weise auch auf die der Wärmerstarre vorausgehenden Erscheinungen Anwendung finden.

---

1) Ueber den Einfluss einiger Chinaalkaloide auf die Leistungsfähigkeit des Kaltblütermuskels. Arch. f. exper. Path. u. Pharm., Bd. 30, 1892, S. 411.

## **Ueber den Stoffwechsel der Cephalopoden.**

Von

**Dr. Otto v. Fürth,**

Privatdocent und Assistent am physiologisch-chemischen Institut  
zu Strassburg i. E.

---

(Aus der zoologischen Station zu Neapel und aus dem physiologisch-chemischen Institut  
zu Strassburg i. F.)

(Der Redaction zugegangen am 3. November 1900.)

---

Unsere Kenntnisse von den Excretionsvorgängen im Stoffwechsel wirbelloser Thiere sind überaus spärlich. Die wenigen auf diesem Gebiete festgestellten Thatsachen beziehen sich im Grossen und Ganzen auf die Ermittlung der chemischen Beschaffenheit von in den Ausscheidungsorganen gefundenen Concrementen, wobei man sich in der Regel mit der Ausführung der Murexidreaction und dergleichen, sowie wie mit der Feststellung der Lösungsverhältnisse und etwa noch der anorganischen Bestandtheile begnügte. Dort, wo die Untersuchung Excremente betraf, konnte im Allgemeinen an eine Trennung des Nierensecrets von den Ausscheidungen des Darmes gar nicht gedacht werden.

Eine eingehende chemische Untersuchung des von den Nieren eines wirbellosen Thieres ausgeschiedenen Harns als solchen ist meines Wissens nie ernstlich in Angriff genommen worden, trotzdem es auf der Hand liegt, dass ohne eine solche ein Urtheil über die Art der Stickstoffausscheidung nicht zu gewinnen war.

Ich benutzte daher einen mehrmonatlichen Aufenthalt an der zoologischen Station zu Neapel, um Materialien zur Lösung dieser Frage zu sammeln. Als Studienobject wählte ich Cephalopoden. Die Lebhaftigkeit und Gefrässigkeit derselben deutete von vornherein auf einen regen Stoffwechsel; die Grösse

und Lebenszungen mancher Repräsentanten dieser Ordnung, namentlich der grossen Octopoden, das häufige Vorkommen derselben im Golfe von Neapel, sowie die anatomischen Verhältnisse liessen den Versuch, auf dem Wege vivisectorischer Eingriffe zu einem Ergebnisse zu gelangen, nicht aussichtslos erscheinen. Meine Erwartungen wurden nicht enttäuscht. Ich erfülle eine angenehme Pflicht, indem ich den Herren Geheimrath Prof. Dr. Dohrn, Prof. Eisig, Prof. Mayer, Cavaliere Dr. Lo Bianco und Dr. Weinland für das mir zu Theil gewordene freundliche Entgegenkommen, Herrn Dr. Lo Bianco insbesondere auch für die reichliche Versorgung mit Thiermaterial meines herzlichen Dankes versichere. Ich möchte es bei dieser Gelegenheit nicht unterlassen, auf den, wie ich glaube, im Kreise der Fachgenossen noch nicht allgemein gewürdigten Umstand hinzuweisen, dass die physiologische Abtheilung der zoologischen Station zu Neapel auch über ein gut ausgestattetes chemisches Laboratorium verfügt, das die Ausführung der gewöhnlichen chemischen Untersuchungen und Operationen am frischen Material an Ort und Stelle gestattet.

#### I. Historisches.

Die Nierensäcke der Cephalopoden, sowie die sogenannten Venenanhänge, deren anatomisches Verhalten weiter unten kurz dargelegt werden soll, wurden als solche und in ihrer physiologischen Bedeutung im Jahre 1835 von Mayer<sup>1)</sup> erkannt. Siebold<sup>2)</sup> fand darin Anhäufungen carmoisinrother rhombischer Krystalle, die von Krohn<sup>3)</sup> bei der Sepia regelmässig angetroffen, beim Octopus, sowie beim Calmar (Loligo) stets vermisst wurden.

Genauere Angaben über die genannten corpusculären Elemente der Sepien rühren von Harless<sup>4)</sup> her. Harless

---

1) Analecten für vergleichende Anatomie, Bonn 1835.

2) Anatomie comparée, Bd. 1, S. 392.

3) Ueber das Vorkommen von Entozoen und Krystallablagerungen in den schwammigen Anhängen der Cephalopoden, Fries's Notizen.

4) Ueber die Nieren der Sepia oder die sogenannten Venenanhänge, Arch. f. Naturg., Bd. 13, S. 1—8, 1847.

fand die Menge derselben sehr verschieden, zuweilen sehr spärlich, zuweilen so reichlich, dass der Grund der Nierensäcke damit angefüllt schien. Die mikroskopische Untersuchung ganz frischer, ohne Wasserzusatz angefertigter Präparate ergab zwei Formen der zinnoberrothen Concremente: einerseits Kugeln, andererseits Krystalle von rhombischer Grundform. Setzte man Wasser zu, so fanden sich nur sehr wenig Kugeln, während die Menge der Krystalle vorherrschend erschien. Wurden die Kugeln mit concentrirter Kalilösung behandelt, so ging der Farbstoff in Lösung, während ein System concentrischer Ringe zum Vorschein kam; das farblose Gerüst löste sich erst theilweise bei längerem Kochen. Wurde ein Präparat gequetscht, so trat eine röthliche Flüssigkeit aus den kugeligen Concremente aus, aus der schöne grosse Krystalle sich abschieden. Harless folgert aus diesen Beobachtungen, dass die vorgefundenen Krystalle nicht nativ vorkommen, sondern vielmehr erst secundär durch Austritt des in den Kugeln in flüssigem Zustande enthaltenen Farbstoffs entstanden seien. Er fand die Krystalle unlöslich in kaltem Wasser, in Alkohol, Aether, in organischen und kalten Mineralsäuren, schwer löslich in heissem Wasser, sehr leicht löslich in Aetzalkalien; sie lösten sich in kochender Salpetersäure mit orangegelber Färbung, die auf Ammoniakzusatz in Purpurroth umschlug. Diesem Verhalten zufolge spricht Harless die Krystalle als Harnsäure an. Das nach Extraction des Farbstoffs zurückgebliebene Gerüst der Concremente enthalte kohlen sauren Kalk und Kieselsäure.

Blasius<sup>1)</sup> fand in Concrementen aus den Harnsäcken von Nautilus nicht die geringsten Spuren von Harnsäure. Dieselben bestanden hauptsächlich aus phosphorsaurem Kalk; daneben fand sich phosphorsaure Ammoniakmagnesia, phosphorsaures Eisenoxyd, ferner schwefel- und phosphorsaurer Kalk.

Paul Bert<sup>2)</sup> bestätigte das Vorkommen der Harnsäure

---

<sup>1)</sup> Bronn, Klassen und Ordnungen des Thierreichs, Bd. 3, S. 1390—91, 1861.

<sup>2)</sup> Mémoire sur la physiologie de la Seiche. — Mem. de la Soc. des Sciences de Bordeaux T. 5, 1867, S. 115—137.

Harnstoff enthalte; doch war das von ihm angewandte Verfahren, wie L. Fredericq (s. u.) richtig bemerkt, eher dazu angethan, etwa vorhandenen Harnstoff zu zerstören, als nachzuweisen, indem er die filtrirte Urinflüssigkeit mit Salpetersäure eindunstete.

Léon Fredericq<sup>1)</sup> fällte 18 ccm. aus den Nierensäcken mehrerer Individuen gesammelten Octopus-Harns von der Dichte 1035 mit dem mehrfachen Volumen Alkohol; es bildete sich ein zum Theil aus eiweissartigen Substanzen bestehender Niederschlag. Das Filtrat desselben wurde am Wasserbade eingedampft, der Rückstand in wenig absolutem Alkohol aufgenommen; die nach Abdunsten des Alkohols zurückgebliebenen Tröpfchen liessen nach Zusatz von etwas Salpetersäure keine für salpetersauren Harnstoff charakteristischen Krystallformen erkennen. Die Alkoholfällung wurde mit Wasser wiederholt ausgekocht. Der Rückstand der wässerigen Lösung zeigte weder eine Krystallisation auf Salpetersäurezusatz, noch gab er die Murexidreaction. Es konnte also weder das Vorkommen von Harnstoff, noch von Harnsäure nachgewiesen werden.

Fredericq untersuchte ferner Concremente, die den Venenanhängen von Octopus anhafteten. Diese lösten sich unter leichtem Aufbrausen in heisser Salpetersäure; die Lösung hinterliess einen citronengelben Rückstand; Zusatz von Ammoniak bewirkte keine Purpurfärbung; dagegen trat auf Zusatz eines Tropfens Kalilauge Rothfärbung auf, die beim Erwärmen in ein schönes Violett überging. Fredericq glaubt aus dieser Reaction auf die Abwesenheit von Harnsäure und auf die Gegenwart von Xanthin oder Guanin im Harne des Octopus schliessen zu sollen.

Huxley<sup>2)</sup> gibt an, dass die Concremente im Harne der Cephalopoden vorwiegend aus phosphorsaurem Kalk bestehen und keine Spur Harnsäure enthalten.

---

1) Sur l'organisation et la physiologie du poulpe. — Bull. de l'Ac. royale de Belgique, 2. Serie, T. 46, No. 11, 1878.

2) The anatomy of invertebrate animals, S. 524, 1877.

Vigelius<sup>1)</sup> widerspricht der Angabe von Harless, dass die von Letzterem beschriebenen Krystalle sich erst secundär durch Austritt von Farbstoff aus den kugeligen Elementen bilden, und schreibt den Krystallen eine selbständige Entstehungsweise zu. Er fand die Krystalle in ihrer Form mit Harnsäurekrystallen übereinstimmend, doch gelang es ihm nicht, eine ausgesprochene Murexidreaction zu erhalten. Neben den von Harless beschriebenen corpusculären Elementen fanden sich im Harn frischer Thiere constant in grosser Menge scharf conturirte Kügelchen von schwach grüner Farbe, die wohl als farbloses Stadium der vorbeschriebenen Kugeln zu betrachten sein dürften.

Zweifeln gegenüber, die an der secretorischen Natur der Venenanhänge der Cephalopoden überhaupt laut geworden waren, wies Solger<sup>2)</sup> nach, dass injicirtes indigschwefelsaures Natron, als dessen specifisches Ausscheidungsorgan bei Säugethieren von Heidenhain die Niere erkannt worden war, durch die Venenanhänge nach aussen geschafft wird und auf seinem Wege das Epithel derselben zu färben vermag.

Krukenberg<sup>3)</sup> fand in den durch Alkohol conservirten Venenanhängen eines Cephalopoden<sup>4)</sup> schöne Krystallrosetten, aus gefärbten Täfelchen mit abgerundeten Ecken bestehend; die Krystalle gaben in ausgezeichneter Weise die Murexidreaction.

Endlich wären zwei aus neuester Zeit stammende Angaben über den Cephalopodenharn zu erwähnen.

Schönlein<sup>5)</sup> erhielt durch Anschneiden der Harnsäcke

---

1) Ueber das Excretionssystem der Cephalopoden, *Niederländ. Archiv für Zoologie*, Bd. 5, S. 129, 1880.

2) Zur Physiologie der sogenannten Venenanhänge der Cephalopoden, *Zool. Anzeiger*, Bd. 4, 1881, S. 379—380.

3) Untersuchungen des physiolog. Instituts Heidelberg, Bd. 2, 1882, S. 412—413.

4) Die Species ist in der betreffenden Abhandlung nicht angegeben. Aus einem Hinweise in Krukenberg, *Vergl. physiol. Vorträge*, Heidelberg 1886, S. 33, ist jedoch zu entnehmen, dass es sich um *Sepia officinalis* gehandelt habe.

5) Notiz über den Harn von *Octopus*. *Zeitschrift für Biologie* Bd. 36, 1898, S. 548.



von Octopus einige Cubiccentimeter eines sauren Harns, der meist sandige, orangerothe Concremente enthielt; diese verbrannten unter Horngeruch, waren löslich in Alkohol und gaben Murexidreaction; der Harn gab auf Zusatz von Calciumchlorid einen reichlichen Gypsniederschlag.

Lindemann<sup>1)</sup> (s. u.) unterband bei einer kleinen Cephalopodenart (*Eledone moschata*) die Nierenausführungsgänge und sah darauf die Thiere innerhalb einiger Tage zu Grunde gehen. Ueber den Harn äussert er sich folgendermassen:

«Bei der Section habe ich die Nephridialsäcke prall mit schleimig trüber Flüssigkeit gefüllt gefunden. Die Flüssigkeit enthielt Sphärokrystalle der Harnsäure, ziemlich viel Zellen (fast ausschliesslich flache Epithelzellen) und bei der chemischen Untersuchung habe ich Ammoniak und Harnstoff nachweisen können. Die Flüssigkeit wurde mit Alkohol gefällt; durch Verdunsten des Alkohols entstand ein krystallinischer Niederschlag, der sich in absolutem Alkohol zum Theil löste. Nach Abdampfen dieses zweiten Extractes entstanden ziemlich zahlreiche Krystalle, welche von Bromlauge unter Gasbildung zersetzt wurden und mit Salpetersäure und Oxalsäure die charakteristischen krystallinischen Verbindungen gaben. Auch war eine ziemlich grosse Menge eines Eiweisskörpers darin enthalten, durch Essigsäure fällbar, löslich in Alkali. Näher habe ich ihn nicht untersucht; allerdings scheint er mit dem Globulin des Blutes nicht identisch zu sein.»

## II. Die Gewinnung des Cephalopodenharns.

Bevor ich zur Beschreibung des zum Zwecke der Gewinnung des Cephalopodenharns von mir geübten Verfahrens übergehe, möchte ich eine kurze, zum Verständniss nothwendige Darlegung der anatomischen Verhältnisse, soweit sie die Octopoden betreffen, vorausschicken. Ich folge dabei im

---

<sup>1)</sup> Urämie bei Cephalopoden. Ziegler's Beiträge zur pathol. Anat. 27. Bd., 1900, S. 490—93.

Wesentlichen den Darlegungen von Vigelius und Grobben,<sup>1)</sup> dessen wichtigen Untersuchungen es in erster Linie vorbehalten war, die einschlägigen, von ihren Vorgängern in sehr widerspruchsvoller Weise gedeuteten Verhältnisse aufzuklären, sowie der übersichtlichen von Vogt und Jung<sup>1)</sup> gegebenen Darstellung.

Bei den Octopoden ist der Bauchtheil des sogenannten Mantels durch eine mediane Muskelmasse mit der die Eingeweide überkleidenden Haut verbunden; wird diese Muskelmasse durchgeschnitten und nach Aufschlitzen des Mantels die Kiemenhöhle besichtigt, so erblickt man den ventralen Theil des Eingeweidesackes, dessen rückwärtiger Abschnitt fast ganz von den beiden, von der Eingeweidehaut überzogenen Harnsäcken eingenommen wird. Diese sind bei Männchen von der Bauchseite her ohne Weiteres zugänglich, bei Weibchen jedoch theilweise von den grossen Nidamentaldrüsen bedeckt. Zu beiden Seiten gewahrt man die auf der Ventralfläche des Harnsackes aufsitzenden kurzen, papillenartig vorspringenden Ureteren. Diese sind beim Octopus asymmetrisch gestellt. Die rechte Ureterpapille liegt nahe der Kiemenbasis; die linke ist weit medianwärts gerückt. Auch die Harnsäcke sind asymmetrisch entwickelt; der rechte ist grösser als der linke. Die Harnsäcke buchten sich nicht nur nach vorn und nach rückwärts von den Papillen aus, sondern schlagen sich auch lateralwärts um die dorsale Seite der Eingeweide herum. (Man kann sich leicht einen Begriff von ihrer Ausdehnung machen, wenn man eine Cantile in die Ureteren einführt und Luft einbläst.) Die Bauchwand des Harnsackes ist glatt, zart und lässt sich nur schwer von der Körperwand lösen. Bei unaufmerksamer Präparation reisst man die Wand des Harnsackes ein, worauf sich die « Venenanhänge » vordrängen. So geschah es denn, dass ältere Autoren die glatte Innenwand des Harnsacks als Bauchfelltasche

---

1) C. Grobben, Morphologische Studien über den Harn- und Geschlechtsapparat, sowie die Leibeshöhle des Cephalopoden. Arb. a. d. zool. Inst. der Univ. Wien, Bd. V, Heft 2, 1883.

2) Vogt und Jung, Lehrb. d. vergl. Anatomie, 1888, Bd. I, S. 885.

auffassten. Die Rückenwand der Harnsäcke ist stark gefaltet, indem sie die schwammigen Anhänge der Hohlvenen überzieht und allen ihren Windungen folgt. Die Venenanhänge ragen in Gestalt spongiöser, geblicher, birn- oder keulenförmiger Gebilde ins Lumen der Harnsäcke hinein. Die Venenanhänge sind bläschenförmige Ausstülpungen der Venenwände; die zahlreichen darin enthaltenen Muskelfasern bewirken die lebhaften schlangenförmigen Bewegungen dieser Gebilde, welche bei der Beobachtung am lebenden Thiere auffallen. Die Venenanhänge sind mit einem Cylinderepithel überkleidet. Die Zellen sind von stark lichtbrechenden Körnern durchsetzt und zeigen eine Streifung an der Basis; die glatten Theile der Nierensäcke sind dagegen von einem Pflasterepithel überzogen. Die Wände der Ureteren sind dicker, längsgefaltet, besitzen eine innere Schicht von Längsmuskeln und eine äussere Schicht von Kreisfasern, sowie ein Cylinderepithel. Aeltere Autoren haben angenommen, dass Meerwasser in die Säcke eindringe, um die Gefässe zu bespülen. Paul Bert<sup>1)</sup> widerlegte diese Annahme durch Versuche mit gefärbten Flüssigkeiten und auch Léon Fredericq<sup>2)</sup> wies auf die Unrichtigkeit dieser Vorstellung hin. Die Muskulatur der Ureteren schliesst im Allgemeinen die Säcke gegen das Meerwasser ab; nur von Zeit zu Zeit wird der Inhalt der Letzteren nach aussen getrieben; die Thiere besitzen sonach die Einrichtung einer echten intermittirenden Harnentleerung.

Durch einfaches Anschneiden der Harnsäcke gewinnt man selbst bei den grössten Exemplaren nur wenige Cubikcentimeter Urin. Um zur chemischen Untersuchung ausreichende Quantitäten davon zu erhalten, ging ich so vor, dass ich die Ureteren unterband, die Thiere einige Tage am Leben liess und sodann den in reichlicher Menge in den prall gefüllten Harnsäcken angesammelten Urin aus denselben entnahm.

Die Unterbindung der Ureteren beim Octopus erfordert einen operativen Eingriff, insofern der Mantel eingeschnitten werden muss, um dieselben bequem zugänglich zu machen. Die Ureteren lassen sich

---

1) l. c.

2) l. c. S. 34 f.

zwar allenfalls auch ohne Weiteres mit einer von der Mantelspalte aus eingeführten langen Pincette fassen, doch ist es beim lebenden, sich mächtig contrahirenden Thiere wohl schwerlich möglich, in dieser Art die Unterbindung durchzuführen, da das zarte Gewebe der Ureterpapillen bei stärkerer Zerrung einreißt. Was den operativen Eingriff selbst betrifft, musste derselbe, da das Thier nach demselben in möglichst normalen Verhältnissen weiterleben sollte, in möglichst schonender Weise und insbesondere derart ausgeführt werden, dass die Athmung durch die Läsion der Mantelmuskulatur in keiner Weise gestört wurde. Nach mannigfachen Versuchen ergab sich mir folgendes Verfahren als zweckmässig.

Der Octopus wird nach dem von Uexküll angegebenen Verfahren<sup>1)</sup> derart gefesselt, dass die 8 Arme in einen Sack gesteckt wurden, worauf man diesen oberhalb der Augen fest zusammenschnürte; eine Manipulation, die in Anbetracht der grossen Kraft und Geschmeidigkeit des Thieres einige Uebungen erfordert. Das Thier wird nun auf einem passend geformten Gestell, das den Sack mit den Armen in eine Art Korb zu lagern gestattet, mit dem Bauche nach aufwärts festgebunden und sogleich vermittelst eines von der Mantelspalte aus in die Kiemenhöhle eingeführten Glasrohres, durch einen kräftigen Strom Seewassers für die Athmung gesorgt. Nunmehr wird an der Bauchfläche des Mantels zunächst durch die Haut, sodann durch die ganze Dicke der Muskelschicht ein Einschnitt gemacht, der auf einer Seite etwa 2 cm. von der Mittellinie und 3 cm. vom oberen Mantelrande beginnend in der Richtung von innen nach hinten aussen in der Länge von 2—3 cm. verläuft. Werden die Schnittränder von einem Assistenten mit Haken auseinander gedrängt, so gelingt es nun leicht, die Ureterpapille der betreffenden Seite zu finden, mit Hülfe einer Hakenpincette vorsichtig vorzuziehen und zu unterbinden. Nun wird die Mantelwunde sogleich durch eine Reihe von Knopfnähten verschlossen, wobei man sich einer starken, gekrümmten Nadel bedienen und die Vorsicht gebrauchen muss, die Bewegungen derselben durch den von oben her durch die Mantelspalte eingeführten Zeigefinger der linken Hand zu überwachen, da sonst, angesichts der oft mächtigen Muskelcontractionen des Thieres, das dicke Wasserstrahlen durch die Mantelwunde herausspritzt, es leicht geschehen kann, dass der Harnsack angestochen wird. Sodann wird die Hautwunde durch eine Matratzennaht geschlossen, die gleiche Operation auf der anderen Seite ausgeführt und das Thier ins Bassin zurückgebracht. Meist erholt sich der Octopus schnell und die Athmung nimmt bald den

---

<sup>1)</sup> Eine Beschreibung dieses Fixirungsverfahrens, sowie eine Abbildung der angewandten Vorrichtung findet sich in einer Arbeit von Ida Hyde, Beobachtungen über die Secretion der sogenannten Speicheldrüsen von *Octopus Macropus*. Zeitschrift für Biologie Bd. 35, S. 469—477.

normalen Rhythmus an. Das angegebene Verhalten besitzt den Vortheil, dass ein dicker, den Mantelrand umgebender Muskelring dabei intact bleibt und so die Athembewegungen weniger gestört erscheinen, als wenn durch einen vom Mantelrande her verlaufenden Einschnitt diese Muskelfasern durchtrennt werden.

Die so operirten Thiere zeigten mit Ausnahme eines kleinen Octopus, der nach 2 Tagen todt aufgefunden wurde, in ihrem Aussehen und Verhalten, sobald sie sich nach Ablauf einiger Stunden vom Eingriffe erholt hatten, keinen Unterschied gegenüber normalen Thieren, mit Ausnahme des Umstandes, dass sie keine Nahrung zu sich nahmen.

Ich pflegte die frisch aus dem Meere gebrachten Thiere womöglich eine Woche, zum Mindesten aber einige Tage vor der Operation in den Bassins des Laboratoriums zu belassen. Da ich die Untersuchung von Stoffwechselprodukten im Auge hatte, musste ich darauf Werth legen, die Thiere womöglich im Zustande der Verdauungsthätigkeit zu operiren und vorher reichlich zu füttern. Es standen ihnen daher in den Bassins stets lebende Exemplare ihrer Lieblingsbeute, *Carcinus maenas*, in ausreichender Menge zur Verfügung. Die Mehrzahl der Octopoden begann denn auch, nach mehrtägigem Aufenthalte im Bassin, Nahrung zu sich zu nehmen.

Ich muss das, mit Ausnahme der Nahrungsverweigerung, anscheinend normale Verhalten der operirten Octopoden um so mehr betonen, als, wie vorerwähnt, Lindemann nach Unterbindung der Ureteren bei einer nahe verwandten Cephalopodenart, *Eledone moschata*, einen sehr auffallenden Symptomencomplex mit pathognostischer Stellung der Extremitäten u. dgl. beschrieben hat, der nach kurzer Zeit den Tod herbeiführte und den er als «Urämie» anspricht. Da die im vergangenen Jahre gleichfalls an der zoologischen Station ausgeführte Untersuchung leider erst, nachdem ich Neapel verlassen hatte, zu meiner Kenntniss gelangte, habe ich es unterlassen, meine Versuche auf *Eledone moschata* auszudehnen. Ich kann aber nicht verhehlen, dass die Deutung der Erscheinungen als Urämie mir um so mehr einer Nachprüfung bedürftig erscheint, als sich doch ein grosser Gegensatz im physiologischen Verhalten so nahe verwandter Gattungen, als es Octopus und *Eledone*<sup>1)</sup> sind, kaum erwarten lässt.

In jenen Fällen, wo ich die operirten Octopoden erst nach Ablauf von mehr als 4 Tagen tödtete, fanden sich die Harnsäcke rupturirt und zwar in der Regel an der Stelle des Ansatzes der Ureterpapille, wo durch das Einscheiden der Ligatur ein locus minoris resistentiae entstanden war. Ich pflegte daher die Thiere 1—3 Tage nach der Operation zu öffnen. Man sieht dann nach Durchtrennung des Mantels die ge-

---

1) Nach Vigelius (l. c.) stimmt die Octopusnieren mit der *Eledone*-nieren bis auf geringe Unterschiede morphologisch überein.

füllten Harnsäcke in Form von gelblichen Blasen sich vorwölben, und nachdem der Mantel umgestülpt worden ist, gelingt es leicht, während das Thier freischwebend gehalten wird, durch einen Einschnitt am abhängigsten Theile des Sackes, den Inhalt vollständig zu entleeren. Anfangs pflegte ich so vorzugehen, dass ich eine feine Canüle in die Ureteren einführte und den Urin durch Ansaugen mit Hülfe einer Pipette gewann, doch empfiehlt sich dies weniger, namentlich weil ein etwa vorhandenes Sediment, das sich in einem Zipfel des vielfach gebuchteten Sackes abgesetzt hat, auf diese Weise leicht der Beobachtung entgeht und eine vollständige Gewinnung des angesammelten Urins, wofern man am lebenden Thiere arbeitet, dabei nicht gewährleistet ist. So gab ich denn auch bald den Versuch auf, dasselbe Thier nach neuerlicher Unterbindung der Ureteren und neuerlicher Naht zu wiederholter Uringewinnung zu benutzen.

Meine Bemühungen, eine Versuchsanordnung zum Zwecke der Beobachtung des zeitlichen und quantitativen Verlaufs der Harnsecretion auszuarbeiten, führten einstweilen zu keinem befriedigenden Erfolge; die geringe Intensität des Secretionsvorganges, das grosse Volumen der Harnsäcke, die Empfindlichkeit des Circulations- und Respirationsapparates, der, wie man sich am Anblick der Kiemenherzen ohne Weiters überzeugen kann, in Unordnung geräth, sobald die Kiemenhöhle in Folge Durchtrennung des Mantels breit freigelegt wird, stehen da hindernd im Wege. Doch zweifle ich nicht daran, dass diese Hindernisse keineswegs unüberwindlich sind. Ein Erfolg wäre um so erwünschter, als das physiologische und pharmakologische Studium der Functionen dieses Secretionsapparates, der sich in so weitgehender Weise von den analogen Organen des Wirbelthieres unterscheidet und gewissermaassen mit einem ungeheueren Glomerulus verglichen werden könnte, über den der Harnsack nach Analogie mit der Baumann'schen Kapsel gestülpt ist, vielversprechend wäre.

Der gewonnene Harn bildete eine, etwas zähe, ganz klare, deutlich saure, schwach gelblich gefärbte Flüssigkeit.

Was die Menge desselben betrifft, unterliegt dieselbe jedenfalls bedeutenden Schwankungen, die wohl in erster Linie von der Ernährung, aber vermuthlich auch von anderen Verhältnissen abhängig sein dürften. In wie weiten Grenzen sich die Schwankungen bewegen, geht z. B. daraus hervor, dass von 2 annähernd gleich grossen Octopoden nach vorhergehender Krabbenfütterung und 3 tägiger Ureterenunterbindung der eine 46 ccm., der andere dagegen 140 ccm. Urin producirt hatte. Letztere Menge bildet das Maximum des mir von einem Thiere gelieferten Nierensecretes. Aus einer Reihe von 9 Beobachtungen an Thieren, die nach 1—4 Tagen getödtet worden

als Minimum . . . . .	15 ccm.,
als Maximum . . . . .	80 ccm.,
als Mittelwerth . . . . .	36 ccm.,

wobei bemerkt werden muss, dass die grössten von der Station gelieferten Octopusexemplare im Gewichte von mehreren Kilo zu den Versuchen benutzt worden sind. Im Allgemeinen scheint mir sowohl die Harnmenge, als insbesondere auch die Menge des Sediments bei gut genährten Thieren grösser zu sein als bei hungernden. Da ich, wie erwähnt, im Beginne meiner Versuche, wo ich den Urin durch Aushebern gewann, nicht genügend auf den Umstand geachtet hatte, dass erhebliche Sedimentmengen in Zipfeln der Harnsäcke versteckt bleiben können, vermag ich über diesen Punkt keine genauen Angaben zu machen.

Auffallend ist es immerhin, dass sich sowohl die weitaus grösste Tagesmenge<sup>1)</sup> Urin, (80 ccm. bei einem 4 kg schweren Octopus), als auch die weitaus grösste Menge Harnsäuresediment (s. u.) bei einem Thiere fanden, das unmittelbar nach einer ganz ungewöhnlich reichlichen Mahlzeit operirt worden war; es handelte sich um einen grossen Octopus, der ein kleineres, im selben Bassin befindliches Exemplar der gleichen Species in der Nacht überfallen und zum Theile verzehrt hatte.

Durch eine weitere Versuchsreihe, die das Gewicht und die Ernährung des Versuchsthieres, die Dauer des Versuchs, die Menge und den Stickstoffgehalt des Harns und des Sediments sowie den Gehalt desselben an Harnsäure genau zu berücksichtigen hätte, wäre es leicht, über diesen Punkt ins Klare zu kommen. Ich beabsichtige das Versäumte bei nächster Gelegenheit nachzuholen.

Die angesammelten Urine wurden, insoweit ich sie nicht sogleich verarbeitete, in gut verschliessbaren Flaschen nach

---

1) Eine relativ noch grössere Urinproduktion ergab sich bei einem Thiere, das 4 Stunden nach subcutaner Injection einer Ammoniumacetatlösung zu Grunde gegangen war und innerhalb dieser Zeit 44 ccm. Urin geliefert hatte.

Zusatz von soviel reinen Toluols aufbewahrt, dass dieses eine zusammenhängende Schichte über der Flüssigkeitsoberfläche bildete.

### III. Untersuchung des Harnsedimentes.

Wie oben erwähnt, fand sich im Harne eines grossen Octopus, der nach einer ungewöhnlich reichlichen Mahlzeit operirt worden war, eine verhältnissmässig beträchtliche Menge von Sediment. Dasselbe bestand aus mohnkorngrossen, röthlich gefärbten Concrementen von unregelmässiger Begrenzung, die bei mikroskopischer Untersuchung eine körnige Beschaffenheit ohne deutliche Structur zeigten.

Eine Probe des Sedimentes hinterliess beim Eindampfen mit Salpetersäure einen citronengelben Rückstand. Zusatz von Ammoniak bewirkte eine orangerothe Färbung, keine Purpurfärbung. Auf Zusatz von Natronlauge trat eine prachttvoll violettrothe Färbung auf.

Eine Probe wurde in warmer verdünnter Natronlauge gelöst. Aus der mit Salzsäure übersättigten Lösung schied sich nach eintägigem Stehen ein feinkörniger Bodensatz ab.

Das gesammte Sediment wurde nunmehr unter verdünnte Salzsäure gebracht. Am nächsten Tage ergab die mikroskopische Untersuchung, dass sich ein grosser Theil desselben in eine farblose Krystallmasse umgewandelt hatte. Die Krystalle bestanden aus dicken Säulen und Nadeln. Die Nadeln lagen theils einzeln, meist aber waren dieselben zu fächerförmigen Rosetten vereinigt. Die Säulen waren an den Enden theils schräg, theils anscheinend senkrecht zu den Seitenflächen begrenzt, theils aufgefaset und erschienen oft treppenartig an einander gereiht. Neben den beschriebenen Formen fanden sich auch sehr feine, parallel an einander gelagerte, beiderseits zugespitzte Nadeln.

Nachdem das Sediment mehrere Wochen in Berührung mit der Salzsäure geblieben war, wurde es mit der Säure am Wasserbade eingeengt, wobei der grösste Theil der Masse in Lösung ging.

Der spärliche Rückstand wurde durch Centrifugiren ab-



centrifugirt. Bei mikroskopischer Untersuchung erwies er sich aus unregelmässig begrenzten Schollen (Zellresten?) bestehend. Er gab keine Murexidreaction.

Proben der klaren gelben Salzsäurelösung zeigten folgendes Verhalten:

Ammoniakalische Silberlösung bewirkte einen reichlichen, gelblich weissen flockigen Niederschlag, der im Ueberschuss von Ammoniak sich auch beim Erwärmen nicht löste. Das Filtrat von diesem Niederschlage, mit ammoniakalischer Magnesiamischung versetzt, gab keine weitere Fällung mehr. Wurde der Silberniederschlag einige Minuten gekocht, so schwärzten sich die Flocken.

Phosphorwolframsäure gab einen gelblichen Niederschlag. Dieser löste sich vollständig beim Erwärmen und schied sich beim langsamen Erkalten in Form sehr regelmässig ausgebildeter bräunlichgelber Würfelchen oder würfelförmlicher Rhomboeder wieder ab. Der Niederschlag wurde durch Decantation gewaschen, mit einigen Tropfen concentrirter Salpetersäure am Wasserbade eingedunstet; der gelbliche Rückstand, in eine Ammoniakatmosphäre gebracht, färbte sich schön rosenroth.

Jodquecksilberkalium bewirkte keine Fällung; auf Zusatz von Natronlauge fiel ein röthlichbrauner Niederschlag aus.

Eine Probe blieb auf Zusatz einer gesättigten wässerigen Pikrinsäurelösung zunächst klar; nach einigem Umschütteln kam es zur Abscheidung eines gelben Krystallpulvers. Bei mikroskopischer Untersuchung erwies sich dieses als durchaus homogen und aus eigenthümlichen y-förmigen Gebilden bestehend, deren zugespitzte Schenkel an den einander zugekehrten Rändern sägeförmige Zähnelungen trugen; die Krystalle lösten sich beim Erwärmen.

Tannin bewirkte keine Fällung, ebensowenig Quecksilberchlorid; dagegen fiel auf Zusatz von Quecksilberacetat ein reichlicher, weisser, grobflockiger Niederschlag aus.

Metaphosphorsäure bewirkte eine aus mikroskopischen Körnchen bestehende, in Salzsäure unlösliche, in Natronlauge lösliche Fällung.

Einige Tropfen der salzsauren Lösung, mit concentrirter Salpetersäure eingedampft, hinterliessen einen gelben Rückstand, der sich, in eine Ammoniakatmosphäre gebracht, sogleich intensiv orangeroth färbte. Zusatz von einem Tropfen Natronlauge löste mit orangegelber Farbe; beim Abdunsten der Lösung nahm der Rückstand eine intensiv blauröthliche Färbung an. Auf Zusatz von Wasser erfolgte wiederum Lösung mit orangegelber Färbung, beim Eindunsten Umschlag in Blauröth.

Einige Tropfen der salzsauren Lösung, mit frisch bereitetem Chlorwasser am Wasserbade eingedampft, hinterliessen einen braungelben Rückstand. Dieser, in eine Ammoniakatmosphäre gebracht, färbte sich zu-

nächst nicht. Beim Erwärmen färbte er sich rothbraun; auf Zusatz von Wasser erfolgte Lösung mit schön purpurrother Färbung, die beim Aufkochen verschwand; auf weiteren Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge trat eine blaurothe Färbung auf (Weidels'sche Reaction).

Eine Probe der salzsauren Lösung, mit Ammoniak übersättigt und reichlich mit 15%iger Ammoniumchloridlösung versetzt, blieb zunächst klar, am nächsten Tage hatte sich ein krystallinischer aus nadelförmigen Prismen bestehender Bodenzusatz gebildet.

Da die mitgetheilten Erscheinungen, wie ersichtlich, es noch zweifelhaft erscheinen liessen, ob eine von der Harnsäure verschiedene Substanz vorliege, oder ob das Verhalten, insoweit es von demjenigen reiner Harnsäure abwich, durch Beimengungen bedingt sei, versuchte ich zum Zwecke weiterer Reinigung aus der Hauptmenge der salzsauren Lösung die Harnsäure nach dem von Jaffé angegebenen Verfahren in Form eines Pikrates abzuscheiden. Zu diesem Behufe wurde die salzsaure Lösung mit gesättigter, wässriger Pikrinsäurelösung versetzt; die Flüssigkeit blieb zunächst klar. Nach einigem Umschütteln und Reiben der Gefässwände mit einem Glasstabe begann die Abscheidung von Krystallen.

Die mikroskopische Untersuchung des schweren Krystallpulvers ergab ein von dem vorbeschriebenen Pikrate durchaus abweichendes Verhalten. Es fanden sich Tafeln mit schiefen Winkeln, einzeln liegend oder aber Rosetten und Durchwachsungen bildend, theils dünn, theils zu dicken Platten und Prismen geformt.

Das nach eintägigem Stehen abgetrennte Krystallpulver wurde mit Pikrinsäurelösung, sodann mit Alkohol ausgewaschen und lufttrocken mit verdünnter Salzsäure behandelt. Beim Aufkochen erfolgte Lösung. Beim Erkalten schied sich Pikrinsäure in langen, intensiv gelb gefärbten Krystallnadeln ab. Es wurde nunmehr mit Aether geschüttelt, wobei sich die Krystalle mit gelber Farbe im Aether lösten; das Ausschütteln wurde mit neuen Portionen Aether so lange wiederholt, als dieser noch eine gelbe Färbung annahm. Noch während des Ausschüttelns begann in der nunmehr entfärbten wässrigen Schichte die Abscheidung farbloser Krystalle.

Bei mikroskopischer Untersuchung erwiesen sich diese

Säulchen mit parallel verlaufenden Seitenläufen und gerader Begrenzung bestehend. Die Krystalle lösten sich nicht in starkem Ammoniak, dagegen leicht in verdünnter Natronlauge und in Natriumcarbonat. Die Lösung in Natriumcarbonat, auf mit Silbernitrat befeuchtetes Filtrirpapier getupft, bewirkte dasselbst dunkle, beim Trocknen des Papiers deutlich hervortretende Flecken.

Eine Probe des abgetrennten Krystallpulvers hinterliess beim Eindampfen mit concentrirter Salpetersäure einen gelben Rückstand, der sich bei stärkerem Erhitzen schwach röthete und auf Zusatz von Ammoniak eine prachtvolle Purpurfärbung, auf weiteren Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge eine schöne blauviolette Färbung annahm.

Eine Probe entfärbte Fehling'sche Flüssigkeit beim Kochen; doch kam es zu keiner Abscheidung von Kupferoxydul.

Es ist also sicher ein Stoff vorhanden, der die qualitativen Reactionen der Harnsäure zeigt. Ein quantitativer Nachweis war im Hinblick auf die geringe Menge nicht zu führen. Vermuthlich war ursprünglich eine Beimengung vorhanden, die die Murexidprobe beeinträchtigte.

#### IV. Untersuchung der Harnflüssigkeit.

Der Harn von Octopus enthält auffallender Weise stets Eiweiss; ich habe dieses niemals vermisst, gleichviel, ob der Harn nach Unterbindung der Ureteren oder ohne diesen Eingriff dem lebenden Thiere entnommen war. Der Eiweissgehalt ist nicht sehr bedeutend (in einem Falle fand ich 0,12%, in einem andern 0,07%), immerhin ist diese physiologische Albuminurie eine beachtenswerthe Erscheinung.

Der Harn begann sich bei langsamem Erhitzen jenseits 50° zu trüben; die Trübung nahm allmählich zu, ballte sich jedoch erst zwischen 75—80° zu einem grobflockigen Niederschlag. Der durch Ammonsulfat ausgesalzene, abfiltrirte und neuerlich in Wasser gelöste Eiweisskörper coagulirte nunmehr bei 80°. Halbe Sättigung des Harnes mit Ammonsulfat bewirkte reichliche, aber nicht vollständige Fällung. Stark verdünnte Essigsäure oder Salzsäure gaben reichliche, im Ueber-

schusse sehr leicht lösliche Niederschläge. Der von Eiweiss befreite Harn gibt weder Biuretreaction noch Fällung mit Essigsäure, enthält sonach weder Mucin noch Pepton.

Das Blut des Octopus enthielt unvergleichlich grössere Eiweissmengen als der Harn (nach L. Fredericq 8—9%). Die für das Blut charakteristische Proteinsubstanz ist das kupferhaltige Hämocyanin; es coagulirt nach Angaben des vorerwähnten Autors zwischen 65—75° und wird von Neutralsalzen innerhalb der Globulinfällungsgrenzen nicht niedergeschlagen. An eine Identität desselben mit dem Harneiweiss ist umsoweniger zu denken, als sich die Beimengung selbst kleiner Hämocyaninmengen zum Harn sogleich durch eine charakteristische bläuliche Färbung zu erkennen gibt, die beim Schütteln mit Luft noch erheblich zunimmt. Ich konnte mich wiederholt bei Gelegenheit des Katheterisirens lebender Thiere davon überzeugen, da es dabei leicht geschieht, dass man die zarten Venenanhänge mit der Canüle verletzt. Wurde der Harn erst einige Zeit nach dem Tode entnommen (z. B. bei Thieren, die von den Fischern todt herbeigebracht wurden), so zeigte derselbe häufig eine zähe, schleimige Beschaffenheit.

Um die Frage nach dem Auftreten von Harnstoff mit Rücksicht auf Lindemann's positive Angaben, sowie auf den Ausfall der Bestimmungen nach Mörner-Sjöqvist (s. u.) zu entscheiden, habe ich zu wiederholten Malen grössere Harnportionen zu 30—40 ccm., meist von gut gefütterten Thieren herrührend, sowohl ganz frisch, dem lebenden Thiere entnommen, als auch unter Toluol conservirt, nach dem Lüdyschen Verfahren auf Harnstoff untersucht. Zu diesem Zwecke wurde der durch Kochen über freier Flamme enteweisste Harn am Wasserbade eingedampft, der Rückstand wiederholt mit kochendem 95%igen Alkohol extrahirt, die filtrirte alkoholische Lösung unter Zusatz einer alkoholischen Lösung von O-Nitrobenzaldehyd eingedampft, der körnige Rückstand so lange mit kochendem Alkohol extrahirt, als sich dieser mit salzsaurer Phenylhydrazinlösung noch röthlich färbte, sodann mit ein wenig 10%iger Schwefelsäure gekocht und salzsaures

eine Spur der charakteristischen Rothfärbung auf.

Da es mir aufgefallen war, dass ein ursprünglich schwach saurer Harn beim Eindampfen auf dem Wasserbade Ammoniak entwickelte, ging ich in zwei Fällen so vor, dass ich das Eindampfen am Wasserbade ganz vermied und die enteieissten Harne im Vacuum über Schwefelsäure bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur zur Trockene dunstete. Das Resultat war gleichwohl ein negatives.

Endlich erschien es mir wahrscheinlich, dass, falls Harnstoff überhaupt als Stoffwechselprodukt der Cephalopoden von wesentlicher Bedeutung sei, er doch wenigstens nach Zufuhr organischer Ammonsalze zum Vorschein kommen müsse, ähnlich wie dies bei Versuchen von W. v. Schröder an Fröschen thatsächlich gelungen ist. Ich injicirte daher einem grossen Octopus nach Unterbindung der Ureteren 7 ccm. einer 5%igen Lösung von essigsaurem Ammon unter die Rückenhaut. Das offenbar schwer vergiftete Thier ging nach Ablauf einiger Stunden zu Grunde. Auch hier gelang es nicht, in dem zähschleimigen, in der Menge von 44 ccm. angesammelten Harn Harnstoff nachzuweisen.

Was die Harnsäure betrifft, welche als wesentlicher Bestandtheil der Harnconcremente für den Stoffwechsel der Cephalopoden wohl von der allergrössten Bedeutung ist, konnte ich dieselbe im Harne als solchem durch die Murexidreaction höchstens in Spuren nachweisen.

Dagegen tritt eine andere Substanz aus der Puringruppe in grösserer Menge auf. 50 ccm. Harn wurden enteieisst, mit Ammoniak übersättigt, der entstandene gelatinöse Niederschlag abfiltrirt und das Filtrat mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Der ziemlich reichliche flockige Niederschlag wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen, sodann in einigen Cubikcentimetern kochender Salpetersäure vom specifischen Gewicht 1,1 unter Zusatz einiger Harnstoffkryställchen (zur Vermeidung des Auftretens salpetriger Säure) gelöst. Aus der heiss filtrirten Lösung schied sich beim Erkalten ein schwerer, farbloser, krystallinischer Niederschlag vom Aussehen der

Hypoxanthinsilberverbindung ab, theils aus feinen graden, zu Büscheln angeordneten Nadeln, theils aus dünnen, länglichen, abgeschrägten, zu zierlichen Rosetten angeordneten Plättchen bestehend. Das Krystallpulver wurde abfiltrirt; das salpetersaure Filtrat blieb beim Uebersättigen mit Ammoniak klar; es war sonach kein Xanthin vorhanden.<sup>1)</sup> Der Niederschlag wurde in Wasser aufgeschwemmt, durch Zusatz einiger Tropfen Schwefelammoniumlösung zersetzt, das Schwefelsilber abfiltrirt, das von Schwefel getrübte Filtrat eingedampft und der Rückstand in einer kleinen Menge kochenden Wassers aufgenommen. Die erkaltete klare Lösung, mit gesättigter wässriger Pikrinsäurelösung versetzt, gab keine auf Adenin zu beziehende Fällung, wohl aber entstand auf weiteren Zusatz von 1 Tropfen Silbernitrat sogleich ein reichlicher, flockiger, gelbbrauner Niederschlag, der, abfiltrirt und gewaschen, an Ammoniak Pikrinsäure abgab, sonach wohl als die Pikrinsäuresilberverbindung des Hypoxanthins angesprochen werden dürfte.

Um einer noch etwa möglichen Verwechslung mit Guanin vorzubeugen, wurde aus einer anderen Harnfraction von 35 ccm., wie vordem, der mit ammoniakalischem Silber fällbare Niederschlag abgetrennt, sodann in Wasser suspendirt, durch Einleiten von Schwefelwasserstoff zersetzt, filtrirt, das Filtrat gekocht und eingeeengt. Metaphosphorsäurezusatz bewirkte keine Trübung; es konnte demzufolge die Gegenwart von Guanin ausgeschlossen werden, das nach Pohl<sup>2)</sup> durch das genannte Reagens gefällt wird.

Um eine, wenn auch nur ganz ungefähre Vorstellung darüber zu gewinnen, wie sich die Menge der in fester Form eliminirten Harnsäure zu derjenigen des Harnhypoxanthins verhält, wurde ein nach reichlicher Krabbenfütterung operirtes Octopusweibchen nach 3 Tagen getödtet und einerseits das ziemlich reichliche, körnige, gelblich rothe Sediment, andererseits der klare, saure, etwas zähflüssige Harn (55 ccm.) möglichst ohne Verlust gesammelt. Sowohl das Sediment als

---

1) Vide Hoppe-Seyler. Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 6. Aufl. S. 493.

2) Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. 13, p. 296.

Silber wurden auf gewogene Filter gebracht, ersteres mit Wasser, letztere mit verdünntem Ammoniak gewaschen und bei 110° getrocknet. Das Gewicht des Sediments betrug 0,0377 g, das der Silberverbindung 0,0104 g, woraus sich die Menge von 0,0043 freiem Hypoxanthin in 55 ccm., von etwa 0,08 g im Liter Harn ergibt, ein Quantum, das die Menge der Purinbasen im Säugethierharn bedeutend übertrifft. Selbstverständlich ist kein Anhaltspunkt vorhanden, um zu beurtheilen, inwieweit das Harnsäuresediment frisch entstanden und inwieweit von früher her in den Harnsäcken angesammelt war.

Was andere im Säugethierharn vorkommende Substanzen betrifft, konnte ich Kreatinin weder durch die Nitroprussidreaction, noch durch die Jaffé'sche Pikrinsäureprobe nachweisen. Auch nachdem der Harn einige Zeit mit Salzsäure gekocht und dann wieder neutralisirt worden war, fielen die Reactionen negativ aus; sonach kann auch das Vorhandensein beträchtlicherer Kreatininmengen ausgeschlossen werden.

Zur Prüfung auf Hippursäure wurden 50 ccm. enteiweissten Harns durch Zusatz einiger Tropfen Natriumcarbonatlösung alkalisch gemacht, auf etwa 5 ccm. eingeengt, mit Salzsäure angesäuert und einige Male mit Essigäther ausgeschüttelt. Der durch Schütteln mit Wasser gewaschene Essigäther hinterliess, bei 40° eingedunstet, nur eine minimale Menge eines fettigen Rückstandes; der Harn enthält sonach keine nachweisbaren Mengen Hippursäure.

Die Prüfung auf gepaarte Schwefelsäuren in der üblichen Art gab ebenfalls ein negatives Resultat. Ebenso die Untersuchung auf Zucker mit Hilfe der Trommer'schen Reaction, sowie derjenigen von Molisch.

Da das Taurin in den Muskeln der Cephalopoden in so reichlicher Menge auftritt, dass nach Angaben einiger Autoren der Fleischsaft dieser Thiere im Wesentlichen einer concentrirten Taurinlösung gleicht, schien es geboten, auch den Harn auf diese Substanz, die offenbar im Cephalopodenorganismus eine wichtige Rolle spielt, zu untersuchen.



Ich benutzte dazu eine grosse Fraction (80 ccm.) Harn; es war dies jener, nach einer ausserordentlich reichlichen Mahlzeit abgesonderte Harn, welcher das oben beschriebene Sediment geliefert hatte.

Der frische Harn wurde von Eiweiss durch Erhitzen befreit und sodann siedend heiss mit einem Ueberschuss frisch gefällten, gut gewaschenen Quecksilberoxyds versetzt. Nach eintägigem Stehen wurde filtrirt, der Filtrerrückstand ausgewaschen, in Wasser suspendirt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, die von Quecksilbersulfid befreite Flüssigkeit eingedampft, der Rückstand in eine kleine Menge heissen Wassers aufgenommen, filtrirt und das klare, gelbe, saure Filtrat bei Zimmertemperatur eingedunstet. Als die Flüssigkeit bis auf etwa 1 ccm. eingengt worden war, fand sich in derselben ein Bodensatz, der neben gekörnten Schollen kugelige Aggregate feiner Nadeln, tyrosinartige Büschel, sowie aus dickeren Nadeln zusammengesetzte Sterne, jedoch keinerlei für Taurin charakteristische Formen enthielt. Der negative Ausfall der Millon'schen Reaction lehrte, dass es sich nicht um Tyrosin handle. Die Mutterlauge enthielt reichliche Mengen Phosphorsäure.

Beachtenswerther Weise enthält Cephalopodenharn eine nicht unerhebliche Menge eines krystallisirten stickstoffhaltigen Körpers, der sich vorläufig mit keinem der bekannten Harnbestandtheile identificiren liess. Zur Darstellung derselben ging ich bei Verarbeitung einer weiteren Harnfraction so vor, dass ich den enteieissten Harn durch Fällung mit einem Ueberschusse von Barytwasser von Phosphaten, Sulfaten etc. befreite. Sodann wurde das Filtrat mit Schwefelsäure schwach angesäuert und die von schwefelsaurem Baryt befreite Flüssigkeit mit Natronlauge genau neutralisirt. Proben derselben wurden weder von Pikrinsäure, noch von Jodquecksilberkalium unter Zusatz von Salzsäure, noch von Quecksilberchlorid gefällt; dagegen bewirkte Quecksilberacetat einen reichlichen weissen Niederschlag. Nunmehr wurde die Gesamtmenge mit Quecksilberacetat gefällt, der ziemlich reichliche, gelblich-weiße Niederschlag abfiltrirt, gut mit Wasser gewaschen, sodann in Wasser suspendirt, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Schwefelquecksilber abfiltrirt und mit kochendem Wasser wiederholt extrahirt und das Filtrat am Wasserbade eingedampft. Aus der auf wenige Cubikcentimeter eingegangenen Flüssigkeit schieden sich Häutchen ab, deren Menge beim Erkalten zunahm.



Bei mikroskopischer Untersuchung zeigte es sich, dass die Häutchen ausschliesslich aus Aggregaten gerader, schlanker, zum Theile sehr langer, farbloser Nadeln bestanden; dieselben lagen theils einzeln, waren aber meist zu zierlichen Büscheln, Sternen und Rosetten angeordnet. Die Nadeln erschienen entweder an einem oder an beiden Enden zugespitzt oder aber prismatisch an beiden Enden durch ebene, anscheinend senkrecht oder etwas schräge zu den Seitenflächen verlaufende Flächen begrenzt.

Nach Zusatz von etwas Wasser gelang es, die Kryställchen durch Centrifugiren von der Mutterlauge abzutrennen und durch zweimaliges Centrifugiren nach Aufschwemmung mit Wasser zu waschen.

Die so gereinigten Nadeln erwiesen sich leicht löslich in heissem Wasser, in Ammoniak, sowie in concentrirter Salzsäure, unlöslich in Essigsäure und verdünnter Salzsäure, schwerlöslich, jedoch nicht unlöslich in Alkohol, unlöslich in Alkoholäther. Sie verbrannten am Platinbleche unter Schwärzung mit hornartigem Geruche. Sie gaben weder Murexid- noch Millon'sche Reaction. Ihre Lösung, durch Erwärmen mit Wasser hergestellt, wurde weder von salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure, noch von neutralem Bleiacetat, noch von Quecksilberchlorid und Mercurinitrat gefällt, wohl aber von Quecksilberacetat, sowie auch von Bleiessig. Die Untersuchung der Krystalle auf Kynurensäure mit der sehr empfindlichen Jaffé'schen Reaction (Erhitzen mit concentrirter Salzsäure bei Gegenwart von Kaliumchlorat; nach dem Erkalten Blaufärbung auf Ammoniakzusatz) fiel negativ aus.

Leider sind 2 Versuche, die Substanz aus grösseren Harnfractionen nach demselben Verfahren darzustellen, gescheitert, indem sich die aus den Quecksilberacetatniederschlägen durch Schwefelwasserstoff erhaltene Lösung beim Eindampfen unter Bildung schwarzer, fest gebundenen Stickstoff enthaltender Produkte zersetzte.<sup>1)</sup>

---

<sup>1)</sup> Dieselben erwiesen sich noch nach längerem Kochen mit Barytwasser als stickstoffhaltig.

Das Filtrat der Quecksilberacetatfällung gab mit salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure noch einen in der Wärme löslichen, beim Erkalten in Form dunkler Globuliten wieder ausfallenden Niederschlag; durch Zerlegung desselben erhielt ich ein schwerlösliches, in regelmässig ausgebildeten mikroskopischen Prismen mit aufgesetzten Pyramiden krystallisirendes, organisches Barytsalz, das keine Murexidereaction gab; die Menge desselben war aber zu gering, als dass ich Näheres darüber auszusagen vermöchte.

Was endlich anorganische Substanzen betrifft, konnte ich im Harn Kalium, Natrium, Ammonium, Calcium, Magnesium, Salzsäure, Schwefelsäure und Phosphorsäure nachweisen. Da die Phosphorsäure sich nach Schmiedeberg's<sup>1)</sup> Angaben im Seewasser nur in so geringen Spuren findet, dass sie bei den gewöhnlichen Wasseranalysen gar nicht und in Kesselsteinen von Seedampfern nicht regelmässig nachweisbar ist, muss sie als ein Stoffwechselprodukt der Cephalopoden angesehen werden.

#### V. Die Stickstoffvertheilung im Cephalopodenharn.

Kürzlich hat Pfaundler<sup>2)</sup> ein Verfahren veröffentlicht, das bei Untersuchung von Harnen in bequemer Weise eine Orientirung darüber ermöglicht, auf welche Hauptkategorien stickstoffhaltiger Verbindungen sich der Harnstickstoff vertheilt und in welchen Mengenverhältnissen diese Verbindungen auftreten.

Ich habe mir das Pfaundler'sche Verfahren zu Nutze gemacht, um einen annähernden Aufschluss über die Art der Stickstoffbindung im Cephalopodenharn zu gewinnen.

Ich widmete diesen Versuchen die beiden grössten Harnfractionen, die mir zu Gebote standen und die, wie oben erwähnt, durch Toluolzusatz conservirt worden waren. Der eine

---

<sup>1)</sup> Schmiedeberg, Ueber die chemische Zusammensetzung der Wohnröhren von *Onuphis tubicola*. Mitth. a. d. zool. Station zu Neapel. 3. Bd. 1882. S. 389.

<sup>2)</sup> M. Pfaundler, Ueber ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harn. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXX, S. 75, 1900. (Aus dem physiol.-chem. Institut zu Strassburg.)

grossen Octopusweibchen her, dem ich nach mehrtägiger Fütterung mit *Carcinus maenas* beide Ureteren unterbunden hatte und das 3 Tage nach der Operation getödtet worden war.

Vom Harn B stand mir eine Menge von 120 ccm. zu Gebote, die sich bei einem mittelgrossen Exemplare im Laufe von 2 Tagen nach vollzogenem Eingriffe angesammelt hatte.

Die Cephalopodenharnen enthielten stets Eiweiss (s. o.). Dieses hatte sich, offenbar in Folge Schüttelns der toluolhaltigen Harnen während des langdauernden Transportes von Neapel nach Strassburg, grösstentheils in Form grosser Flocken abgeschieden. Diese wurden auf gehärteten, zur Gewichtsconstanz getrockneten Filtern gesammelt, die in den Filtraten noch befindliche Eiweissmengen durch Kochen über freier Flamme coagulirt und aufs Filter gebracht, die gesammelten Eiweissniederschläge mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und bei 110° zur Gewichtsconstanz getrocknet.

Zur Bestimmung der Trockensubstanz und des Mengenverhältnisses anorganischer und organischer Bestandtheile wurden 10 ccm. des Harnes in einem Platintiegel eingedunstet, der Rückstand bei 100° zur Gewichtsconstanz getrocknet und durch kurzdauerndes starkes Glühen verascht.

Die Bestimmung des Gesamtstickstoffs in abgemessenen Portionen des enteiuweisssten Harnes geschah nach Kjeldahl, die Bestimmung des Ammoniaks nach Schlösing.

Zur Bestimmung des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs wurden je 20 ccm. Harn nach Pfaundler mit 40 ccm. eines durch Auflösen von 100 g reiner krystallisirter Phosphorwolframsäure in 800 ccm. Wasser unter Zusatz von 100 ccm. Salzsäure (specifisches Gewicht 1,124), bereiteten Reagens versetzt. Der Niederschlag wurde nach zweitägigem Stehen in ammoniakfreier Atmosphäre auf einem aschearmen Filter gesammelt und mit der Fällungsflüssigkeit gewaschen.

Handelte es sich um Bestimmung des gesammten durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs, so wurde das Filter mit dem Niederschlag in einen Rundkolben gebracht und nach Kjeldahl zersetzt.

Pfaundler theilt aber diesen Stickstoff in 2 Fractionen, in einen Antheil, der durch Erhitzen mit Phosphorsäure auf 150° in Ammoniak übergeführt wird ( $n_1$ , als Ammoniak abspaltbarer Stickstoff), und in einen zweiten Antheil, der diesem Verfahren widersteht ( $n_2$ , nicht abspaltbarer Stickstoff). Ganz analog wird auch der durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff in 2 Fractionen  $f_1$  und  $f_2$  getheilt. Bezüglich der Einzelheiten des Verfahrens verweise ich auf die Arbeit Pfaunders.

Die Werthe  $n_2$  und  $f_2$  ergaben sich durch Berechnung. Zur Ausführung der Bestimmungen nach Mörner-Sjöqvist wurden Harnportionen

zu 10 ccm. mit 10 ccm. einer gesättigten Chlorbaryumlösung, die 5% Baryhydrat enthielt, sodann mit 200 ccm. eines Gemenges gleicher Theile 96%igen Alkohols und Aether versetzt, am nächsten Tage in einem Rundkolben filtrirt, die Filtrate unter Zusatz von geglühter Magnesia bei einer 60° nicht übersteigenden Temperatur abdestillirt. Der Rückstand wurde nun entweder ohne Weiteres zum Zwecke der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl zersetzt, oder aber wiederum zur Feststellung jenes Stickstoffantheils benutzt, der sich daraus durch Erhitzen mit Metaphosphorsäure in Form von Ammoniak abspalten lässt.

Zu diesem Zwecke wurde der Destillationsrückstand durch Filtration von ungelöster Magnesia befreit, mit Wasser nachgewaschen, mit 5 g Metaphosphorsäure über Nacht auf 150°—160° erhitzt und das entstandene Ammoniak wie oben durch Destillation mit Magnesia bestimmt.

Ich führe die Ergebnisse der Analysen in tabellarischer Form an.

Die Eiweissbestimmung ergab für den Harn A einen Gehalt von 0,12%, für B von 0,07%.

Im Harne A fand sich: 94,68% Wasser,  
3,63% anorganische Bestandtheile,  
0,12% Eiweiss,  
1,57% andere organische Substanzen.  
100,00%

Zum Vergleiche führe ich eine von Léon Fredericq<sup>1)</sup> ausgeführte Analyse des Octopusblutes an:

86,3% Wasser,  
3,0% Salze,  
8,9% Eiweisskörper,  
1,8% andere organische Substanzen.  
100,0%

Art der Bestimmung	100 ccm. Harn A (enteiweisst) enthalten		100 ccm. Harn B (enteiweisst) enthalten	
	Gramm Stickstoff	Procent- Vertheil. des N.	Gramm Stickstoff	Procent- Vertheil. des N.
Gesamtstickstoff des Harns	0,00420 0,00420 }	100%	0,00340	100%
Ammoniakstickstoff (nach Schlössing) .....	0,00077	18,6%	0,00063	18,6%

<sup>1)</sup> l. c.

Art der Bestimmung	100 ccm. Harn A (enteiweisst) enthalten		100 ccm. Harn B (enteiweisst) enthalten	
	Gramm Stickstoff	Procent- Vertheil. des N.	Gramm Stickstoff	Procent- Vertheil. des N.
Harnstoffbestimmung nach Mörner-Sjöqvist.....	—	—	α) 0,00156	45,9%
dto. mit Abspaltung des N durch Phosphorsäure.....	—	—	β) 0,00112 <sup>1)</sup>	32,9%
			γ) 0,00056	16,5%
Phosphorwolframsäurenieder- schlag, Gesamtstickstoff..	0,00270	64,3%	0,00210	61,8%
Phosphorwolframsäurefiltrat Gesamtstickstoff				
berechnet ...	0,00150	35,7%	0,00130	38,2%
gefunden ...	0,00182	100,0%	—	100,0%
Phosphorwolframsäurenieder- schlag, abspaltbarer Stick- stoff n <sub>1</sub> , gefunden .....	0,00175	41,7%	0,00119	35,0%
Phosphorwolframsäurenieder- schlag, nicht abspaltbarer Stickstoff n <sub>2</sub> , berechnet....	0,00095	22,6%	0,00091	26,8%
Phosphorwolframsäurefiltrat, abspaltbarer Stickstoff f <sub>1</sub> , gefunden.....	0,00063	15,0%	0,00042	12,4%
Phosphorwolframsäurefiltrat, nicht abspaltbarer Stick- stoff f <sub>2</sub> , berechnet.....	0,00087	20,7%	0,00088	25,8%
	0,00420	100,0%	0,00340	100,0%

Zum Vergleiche führe ich einige von Pfandler ermittelte Werthe für die procentische Vertheilung des Stickstoffs im Harne des Menschen und des Hundes an.

	n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	f <sub>1</sub>	f <sub>2</sub>	Ammoniak- Stickstoff
Menschlicher Harn	8,53	6,81	78,24	4,76%	—
Hund I	7,54	5,01	83,52	2,22%	4,30%
Hund II	6,96	2,23	85,91	4,30%	4,03%

1) Der Vorgang bei der Vornahme der beiden Bestimmungen war ein abweichender, insofern bei α) und γ) ein Gemenge von gleichen Theilen Alkohol und Aether, bei β) ein Gemenge von zwei Theilen Alkohol und einem Theil Aether angewandt wurde.

Die für die beiden untersuchten Harne gefundenen Zahlen zeigen eine, in Anbetracht der Kleinheit der absoluten Werthe, um die es sich handelt, befriedigende Uebereinstimmung in Bezug auf das gegenseitige Verhältniss der Stickstoffvertheilung auf die einzelnen Fractionen. Die nähere Betrachtung unter Berücksichtigung der von Pfaundler für den Säugethierstoffwechsel festgestellten Beziehungen gestattet einige Schlüsse über die Art, in welcher der Cephalopodenorganismus seine Stickstoffausscheidung bewerkstelligt.

Die Fraction  $n_1$  umfasst nach Pfaundler von den wichtigeren, bisher bekannten Harnbestandtheilen die Gesamtmenge des Ammoniaks und der Carbaminsäure, sowie einen Theil der Harnsäure, der Purinbasen und des Kreatinins. Im Octopus-harne ist die Fraction  $n_1$  weitaus die grösste. Wie die direkte Bestimmung nach Schlösing lehrt, ist die relative Menge des Ammoniakstickstoffs eine sehr grosse und übertrifft diejenige des Hundes etwa um das Vierfache; der Octopus scheidet etwa  $\frac{1}{8}$  seines gelösten Stickstoffs in Form von Ammoniak aus. Der Ammoniakstickstoff macht aber nur etwa die Hälfte der Fraction  $n_1$  aus. Da die Harnsäure in gelöster Form kaum in Betracht kommt, Kreatinin nicht nachgewiesen werden konnte, so entfällt der Rest der Fraction auf Hypoxanthin. Die oben angeführte quantitative Bestimmung des Hypoxanthins lässt aber kaum die Annahme zu, dass dieses allein das erwähnte grosse Stickstoffdeficit decken könne. Es handelt sich jedenfalls daneben um andere Substanzen unbekannter Art.

In der Fraction  $f_1$  traf Pfaundler den gesammten Harnstoff und etwa die Hälfte der Oxyproteinsäure an; auch Allantoin, Oxalursäure und Kreatin finden hier ihren Platz. Beim Säugethier ist diese Fraction die bei Weitem grösste; beim Octopus-harn ist sie gerade umgekehrt die kleinste. Diese Thatsache steht in Uebereinstimmung mit dem negativen Resultate der qualitativen Untersuchung auf Harnstoff. Immerhin müssen an Stelle des Harnstoffs andere, leicht Ammoniak abspaltende Substanzen vorhanden sein. Da ein Versuch ergab, dass bei Anwendung des Verfahrens von Mörner-Sjöqvist sich nach

nicht aber durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanz findet, ist die Vermuthung nicht ungerechtfertigt, dass die vorerwähnte durch Quecksilberacetat fällbare, in Nadelbüscheln krystallisirende, stickstoffhaltige Säure eine jener Substanzen sei, deren Stickstoff bei dem genannten Harnstoffbestimmungsverfahren, sowie auch in den Fractionen  $f_1$  und  $f_2$  zum Vorschein kommt.

Die Fraction  $f_2$  enthält nach Pfaundler, neben dem Reste der Oxyproteinsäure, den Stickstoff der vorhandenen Amidosäuren, wie Hippursäure, Taurin, Cystin, Leucin, Tyrosin. Ich vermochte keine der letztgenannten Substanzen im Octopusharne nachzuweisen, obgleich hier diese Fraction einen viel grösseren Theil des Stickstoffs ausmacht, als beim Säugethier.

Im Ganzen ergibt der Vergleich der Harnausscheidung der Cephalopoden mit derjenigen der Wirbelthiere, dass bei Ersteren die Verhältnisse der niedrigeren Entwicklungsstufe entsprechen. Während bei den Säugethieren der weitaus grösste Theil des Ammoniakstickstoffs vor der Ausscheidung durch die Nieren in Harnstoff umgeformt wird und diese Organe im normalen Zustande keinem Eiweisskörper in nennenswerther Menge den Durchtritt gestatten, sehen wir im Cephalopodenharn viel Stickstoff in Form von Ammoniak den Körper verlassen; der Harnstoff scheint zu fehlen und ist, wenigstens zum Theil, ebenso wie bei den niedrigeren Wirbelthieren durch Harnsäure vertreten; endlich erscheint das normale Auftreten von Eiweiss im Harne als ein weiteres, vom vergleichend physiologischen Standpunkte beachtenswerthes Moment.

---

## Ueber die Harnstoffbestimmung im Harn.

Von

Dr. Al. Braunstein.

---

(Aus dem med.-chem. Laboratorium der Kaiserl. Univ. zu Charkow.)

(Der Redaction zugegangen am 4. November 1900.)

---

Im Jahre 1891 wurde von Mörner und Sjöqvist<sup>1)</sup> ein genaues und bequemes Verfahren für die quantitative Harnstoffbestimmung vorgeschlagen. Das Princip desselben besteht darin, dass die stickstoffhaltigen Bestandtheile des Harns, mit Ausnahme von Harnstoff, durch die Lösung von Baryumchlorid und Barythydrat unter Zusatz von Alkoholäther (1 : 2) ausgefällt werden. Die Lösung soll dann nur den Harnstoff und eine kleine Menge von Ammoniak enthalten, welch letzteres beim Eindampfen des Filtrats bei einer Temperatur, die 55° C. nicht übersteigen darf, unter Zusatz von Magnesiumoxyd verjagt wird. Der Stickstoffgehalt der Flüssigkeit wird schliesslich nach Kjeldahl's Verfahren bestimmt. E. Bödtker<sup>1)</sup> hat das Verfahren von Mörner-Sjöqvist geprüft, indem er dem Harn Ammoniaksalze, Hippursäure und Kreatinin zugesetzt und dann den Stickstoffgehalt nach Mörner-Sjöqvist bestimmt hat; der Zusatz der genannten Stoffe veranlasste dabei kein einziges Mal eine Stickstoffzunahme. Nach Bödtker soll das Verfahren von Mörner-Sjöqvist nach seiner Genauigkeit und bequemen Ausführung nichts zu wünschen übrig lassen. Doch haben S. Salaskin<sup>2)</sup> und J. Zaleski bei ihren Harnstoffbestimmungen

---

1) Diese Zeitschr., Bd. XVII, S. 140—146.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 73—87. 1899.



in Harn eines kranken Menschen (Sjögqvist's) erhaltenen zu grosse Zahlen (fast das Doppelte des in der That vorhandenen Harnstoffs) erhalten. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Rückstandes von dem eingedampften alkoholisch-ätherischen Filtrat fanden darin die Verfasser die Hippursäure. Durch diesen Befund veranlasst, haben Salaskin und Zaleski eine Modification des Mörner-Sjögqvist's Verfahren vorgeschlagen, welche darin besteht, dass die nach dem Eindampfen der Alkoholätherlösung erhaltene Flüssigkeit 3 Stunden lang in einem zugeschmolzenen Rohre bei 130—140° C. mit 4 ccm. Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,124 erhitzt wird. Die nach dieser Modification erhaltenen Werthe stimmen mit den nach Schöndorf's<sup>1)</sup> Verfahren gefundenen gut überein. Auf Grund dieser Untersuchungen zogen Salaskin und Zaleski den Schluss, dass Mörner-Sjögqvist's Verfahren überhaupt keine genauen Werthe gibt und für die quantitative Harnstoffbestimmung im Harn von grasfressenden Thieren gar nicht brauchbar ist.

Bei den Bestimmungen der Grösse der Stickstoffausscheidung in dem Harn von Meerschweinchen und Kaninchen bei verschiedenen Nahrungszuständen habe ich das Mörner-Sjögqvist'sche Verfahren wegen seiner Genauigkeit und bequemen Ausführung allen anderen Methoden der Harnstoffbestimmung vorgezogen.<sup>2)</sup> Doch haben mich die Resultate, welche ich dabei erhalten habe (der Harnstoffstickstoff machte im Mittel etwa 96% der gesammten Stickstoffmenge aus), veranlasst, das Verfahren zu kontrolliren. Da der Harn der Meerschweinchen Hippursäure enthält, habe ich die Böttker'sche Untersuchung wiederholt, jedoch mit der Modification, dass die Hippursäure zur Harnstofflösung und nicht zum Harn, wie Böttker es machte, zugesetzt wurde.

Es wurden zwei Portionen zu 5 ccm. einer Harnstofflösung genommen, welche in 5 ccm. 0,07302 g des chemisch

---

1) Pflüger's Archiv, Bd. LXII, S. 1—57.

2) Die Salaskin-Zaleski'sche Arbeit war mir damals noch nicht bekannt.

reinen Harnstoffs oder 0,03408 g N enthielt. Zu der einen Portion wurden ungefähr 0,35 g und zu der anderen etwa 0,035 g Hippursäure zugesetzt; dann wurde der Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist bestimmt.

1. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 57,5  
 $42,5 \times 0,0014 = 0,05950$  g N.
2. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 72,8  
 $27,2 \times 0,0014 = 0,03808$  g N.

Die erste Portion enthielt 0,03408 g Harnstoffstickstoff, während die Bestimmung nach Mörner-Sjöqvist 0,05950 g N, d. h. 0,02542 g N mehr ergab. Die überschüssige Stickstoffmenge sollte durch die Zerlegung der Hippursäure gebildet werden.

Desgleichen wurden auch in der zweiten Portion anstatt der genommenen 0,03408 g Harnstoffstickstoff nach Mörner-Sjöqvist 0,03808 g N, d. h. 0,00400 g N mehr gefunden.

Es wurden zwei weitere Portionen zu 5 ccm. einer anderen Harnstofflösung genommen (5 ccm. der Lösung enthielten 0,10718 g Harnstoff oder 0,05002 g N). Die eine Portion wurde mit 0,2266 g und die andere mit 0,1182 g der chemisch reinen und getrockneten Hippursäure versetzt und der Stickstoff nach Mörner-Sjöqvist bestimmt.

1. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 52,6  
 $47,4 \times 0,0014 = 0,06636$  g N.
2. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 58,2  
 $41,8 \times 0,0014 = 0,05852$  g N.

In beiden Portionen wurde nach Mörner-Sjöqvist mehr Harnstoffstickstoff gefunden und zwar: in der ersten um 0,01634 g mehr und in der zweiten um 0,00850 g mehr. Die Differenz entspricht gerade der zu der Harnstofflösung zugesetzten Hippursäuremenge; im ersten Versuche beträgt der Stickstoffgehalt der Hippursäure 0,01772 g N und im zweiten 0,00924 g N.

Es liegt auf der Hand, dass bei der Bestimmung des Harnstoffs nach Mörner-Sjöqvist die ganze der Harnstofflösung zugesetzte Hippursäure im ätheralkoholischen Filtrat zurückbleibt und dann bei der Erhitzung mit Schwefelsäure vollständig zersetzt wird. Dass die wässerige Lösung vom Barytsalz der Hippursäure durch die Mischung von Aether und Alkohol nicht gefällt wird, und dass somit die Hippursäure bei der Bearbeitung des Harns nach Mörner-Sjöqvist in die Alkoholätherlösung übergehen muss, habe ich dadurch bewiesen, dass ich 0,3 g hippursäuren Baryt in 10 ccm. Wasser gelöst und der Lösung 100 ccm. einer Alkoholäthermischung (2:1) hinzugesetzt habe: die Flüssigkeit blieb bis zum folgenden Tage stehen, wobei keine Spur von Niederschlag zu constatiren war.

Um den Fehler zu beseitigen, welcher bei der Bestimmung des Harnstoffs nach Mörner-Sjöqvist in Folge des Hippursäuregehaltes des Harnes entsteht, habe ich das Verfahren insofern modificirt, dass die wässerige Flüssigkeit, welche nach dem Eindampfen des alkoholätherischen Filtrats, unter Zusatz von Magnesiumhydroxyd nach Mörner-Sjöqvist, erhalten wird, mit der krystallinischen Phosphorsäure  $4\frac{1}{2}$  Stunden lang bei einer Temperatur, die  $150^{\circ}$  C. nicht übersteigen darf, erhitzt wird. Bei dieser Temperatur wird die Hippursäure nicht zerlegt, wie es Schöndorf<sup>1)</sup> nachgewiesen und wie ich es bestätigt habe.

0,35 g resp. 0,02 g Hippursäure wurden mit je 10 g krystallinischer Phosphorsäure bei  $140-145^{\circ}$  C.  $4\frac{1}{2}$  Stunden lang erhitzt. Die syrupartigen Flüssigkeiten wurden nach dem Erkalten mit Wasser verdünnt und das eventuell gebildete Ammoniak aus den mit der Kalilauge alkalisch gemachten Lösungen in die  $\frac{1}{10}$  normale Schwefelsäure überdestillirt.

1. Vorlage 50 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 50,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH

Titration . . . . . 49,8

$$0,2 \times 0,0014 = 0,00028 \text{ g N.}$$

2. Vorlage 50 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 50,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH

Titration . . . . . 49,9

$$0,1 \times 0,0014 = 0,00014 \text{ g N.}$$

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. LXII, S. 1—57.

Diese zwei Versuche weisen noch darauf hin, dass die von mir benutzte krystallinische Phosphorsäure kein Ammoniak enthielt.

Nun wurden je 5 ccm. Harnstofflösung (0,7302 g des chemisch reinen Harnstoffs in 50 ccm. Lösung) genommen und mit 10 g krystallinischer Phosphorsäure  $4\frac{1}{2}$  Stunden lang bei 140—145° C. erhitzt. Nach dem Erkalten wurde das gebildete Ammoniak bestimmt.

1. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 75,7  
 $24,8 \times 0,0014 = 0,03402 \text{ g N.}$
2. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 75,7  
 $24,3 \times 0,0014 = 0,03402 \text{ g N.}$

Im Mittel wurden somit 0,03402 g N gefunden, während 0,07302 g Harnstoff oder 0,03408 g N vorhanden waren.

Zwei Portionen zu 5 ccm. derselben Harnstofflösung wurden mit je 5 Tropfen 10%iger Natriumphosphatlösung versetzt und in der Mischung wurde der Harnstoffgehalt nach dem ursprünglichen Verfahren von Mörner-Sjöqvist bestimmt.

1. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 76,1  
 $23,9 \times 0,0014 = 0,03346 \text{ g N.}$
2. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 76,2  
 $23,8 \times 0,0014 = 0,03332 \text{ g N.}$

Im Durchschnitt wurden 0,03339 g Harnstoffstickstoff gefunden. Die Differenz beträgt 0,00069 g N.

Es wurden zwei Portionen der Harnstofflösung genommen, die 0,10718 g Harnstoff in 5 ccm. enthielt: 1. 5 ccm. der Lösung wurden mit 0,4 g Hippursäure und 2. 2,5 ccm. der Lösung mit 0,2 g Hippursäure versetzt. In den beiden Fällen wurde der Harnstoffgehalt nach dem von mir modifizirten Verfahren bestimmt.

1. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 64,5  
 $35,5 \times 0,0014 = 0,0497 \text{ g N.}$

der Harnstoffstickstoffgehalt 0,05002 g N, 0,04970 g N sind wiedergefunden. Differenz = 0,00032 g N.

2. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 82,3

$$17,7 \times 0,0014 = 0,02478 \text{ g N.}$$

Also 0,02501 g N genommen, 0,02478 g N gefunden.  
 Differenz = 0,00023 g N.

Aus den angeführten Versuchen folgt somit, dass der Zusatz von Hippursäure zur Harnstofflösung keinen Einfluss auf die Resultate der nach dem von mir vorgeschlagenen Verfahren ausgeführten Harnstoffbestimmungen hat.

Ich habe noch eine Parallelbestimmung des Harnstoffs nach dem Verfahren von Salaskin-Zaleski und nach dem meinigen ausgeführt.

Zu dem Zwecke wurden 30 ccm. Meerschweinchenharn mit 0,2 g Hippursäure versetzt, das nach Mörner-Sjöqvist erhaltene Alkoholätherfiltrat auf dem Wasserbade bei 50° C. unter Zusatz von Magnesiumhydroxyd eingedampft, die übrig gebliebene Flüssigkeit mit Wasser auf 50 ccm. verdünnt und von dieser Lösung zwei Portionen zu 5 ccm. für die Bestimmung des Harnstoffs nach dem von mir modificirten Mörner-Sjöqvist's Verfahren genommen.

1. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH .  
 Titration . . . . . 86,2

$$13,8 \times 0,0014 = 0,01932 \text{ g N.}$$

2. Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 86,1

$$13,9 \times 0,0014 = 0,01946 \text{ g N.}$$

Im Mittel 0,01939 g N.

In den dritten 5 ccm. wurde der Harnstoff nach Salaskin-Zaleski bestimmt.

Vorlage 100 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm.  $H_2SO_4$  — 100,0 ccm.  $\frac{1}{10}$  norm. KOH  
 Titration . . . . . 86,4

$$13,6 \times 0,0014 = 0,01904 \text{ g N.}$$

Die nach beiden Methoden gefundenen Zahlen stimmen somit gut überein und die Differenz beträgt nur 0,00035 g N.

Die Harnstoffbestimmung wird nach dem von mir modifizierten Verfahren auf folgende Weise ausgeführt:

5 ccm. Harn werden mit 5 ccm. einer Mischung von Baryumchlorid und Barythydrat und mit 100 ccm. Alkoholäther (2 : 1) gefällt und das Gefäß verschlossen. Am folgenden Tage wird die Flüssigkeit filtrirt, der Niederschlag 6—7 Mal mit etwa 50 ccm. Alkoholäther ausgewaschen und das Filtrat bei einer 55° C. nicht übersteigenden Temperatur eingedampft. Nach dem Verjagen von Aether und Alkohol wird etwas Wasser und eine Messerspitze Magnesiumoxyd zugesetzt und die Flüssigkeit weiter eingedampft, bis die Dämpfe keine alkalische Reaction mehr zeigen. Die bis auf 10—15 ccm. eingeeengte Flüssigkeit wird in einen kleinen Erlenmeyer'schen Kolben übergeführt, in welchen vorher 10 g krystallinische Phosphorsäure geschüttet sind.<sup>1)</sup> Das Gemisch wird in einem mit einem Thermoregulator versehenen Luftbad  $4\frac{1}{2}$  Stunden lang bei 140—145° C. (nicht über 150° C.) erhitzt; die Verdampfung des Wassers nimmt nicht mehr als eine Stunde in Anspruch. Nach dem Erkalten wird der Rückstand in Wasser gelöst, die Lösung quantitativ in einen Kjeldahl'schen Destillationskolben übergeführt, mit Kalilauge alkalisch gemacht und das Ammoniak in die titrirte Schwefelsäure abdestillirt. Beim Zusatz von Kalilauge<sup>2)</sup> wird die Flüssigkeit nicht warm, wodurch ein Ammoniakverlust vermieden wird.

Auf Grund der von mir erzielten Resultate bin ich zu folgenden Schlüssen berechtigt:

1. Das Mörner-Sjöqvist'sche Verfahren ist für die quantitative Harnstoffbestimmung in Hippursäure enthaltenden Flüssigkeiten nicht brauchbar.

---

1) Da die krystallinische Phosphorsäure nicht immer und nicht überall zur Verfügung steht, versuchte ich dieselbe durch Acid. phosph. liquid. zu ersetzen und fand, dass dieselbe den Harnstoff ebenso gut und vollständig zerlegt wie die krystallinische Säure.

2) Es genügen dazu 60—70 ccm. der 28%igen Kalilauge, während bei der Bestimmung nach Mörner-Sjöqvist mit 20 ccm. Schwefelsäure 150 bis 160 ccm. Kalilauge verbraucht werden.

2. Die Angabe Böttker's, dass die Hippursäure keinen Einfluss auf die Resultate der Harnstoffbestimmung nach Mörner-Sjöqvist's Verfahren hat, ist nach meinen Versuchen nicht verständlich.
3. Das von mir vorgeschlagene Verfahren der quantitativen Harnstoffbestimmung gibt richtige Resultate und kann, in Anbetracht seiner Einfachheit und Bequemlichkeit, einen gewissen Vorzug gegen die übrigen genauen Methoden der Harnstoffbestimmung haben, was besonders für die praktischen Ziele und für die in chemischen Manipulationen weniger geübten Untersucher von Wichtigkeit sein muss.

Zum Schluss halte ich es für eine angenehme Pflicht, dem Herrn Prof. Wl. Gulewitsch, unter dessen Leitung ich diese Arbeit ausgeführt habe, für seine Rathschläge meinen innigsten Dank auszusprechen.

---

## Notiz über Glycocoll.

Von

Docent Dr. **Adolf Jolles** in Wien.

---

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. u. Dr. Ad. Jolles in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 7. November 1900.)

---

Nachdem bei zahlreichen Reactionen physiologisch wichtiger Substanzen, wie Eiweisskörper, Purinbasen, Hippursäure etc., als Spaltungsprodukt Glycocoll in wechselnden Mengen auftritt, so habe ich mich veranlasst gesehen, diesen Körper bezüglich seines Verhaltens gegenüber gewissen Reagentien — insoweit dies meine Arbeiten über die Spaltungen der Purinbasen<sup>1)</sup> etc. tangirt — zu studiren.

Zunächst habe ich reines Glycocoll der Einwirkung von Permanganat in schwefelsaurer Lösung in der Kochhitze unterworfen, und zwar in gleicher Weise, wie ich dies zum Zwecke der Spaltung der Purinbasen angegeben habe.<sup>1)</sup> Demzufolge wurden circa 0,5 g Glycocoll in etwa 400 ccm. Wasser gelöst, 10 ccm. concentrirte Schwefelsäure hinzugefügt und auf dem Drahtnetze gekocht, unter tropfenweisem Zusatz einer Permanganatlösung, die pro Liter 8 g  $\text{KMnO}_4$  enthielt. Hierbei trat selbst bei anhaltendem Kochen keine wahrnehmbare Entfärbung des Permanganates ein, und es konnte auch keine Spaltung constatirt werden. Das Glycocoll erwies sich somit als sehr resistent gegen Permanganat in saurer Lösung, so dass die Oxydation unter den eingehaltenen Bedingungen so gut wie gar nicht stattfindet. Der Grund hierfür dürfte offen-

---

<sup>1)</sup> Ueber eine quantitative Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten. Von Adolf Jolles. Ber. d. d. chem. Gesellsch, Bd XXXIII S. 1246 und 2120.



bar in der ringförmigen Structur des Glycocolls  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-O}$  zu suchen sein, das in der sauren Lösung als inneres Salz der Amidoessigsäure vorhanden ist. Für diese Auffassung spricht nicht nur der Umstand, dass in alkalischer Lösung, wo der Ring nach Analogie der Lactone aufgespalten wird, die Oxydation zu Harnstoff erfolgt,<sup>1)</sup> sondern auch die Beobachtung, dass Glycocoll ester, indem der Eintritt der Aethylgruppe den Ringschluss unmöglich macht, sofort Permanganat entfärbt.

Bei der Einwirkung von starker Lauge auf Glycocoll bildet sich nach Harsford (Ann., Bd. 60, S. 1) Ammoniak. Ich habe diesen Versuch in der Weise wiederholt, dass ich gewogene Mengen von Glycocoll mit concentrirter Kalilauge (1:1) in bedeutendem Ueberschusse versetzt und mehrere Stunden im Kjeldahl-Destillationskolben behandelt habe. Das Destillat wurde in Salzsäure aufgefangen, abgedampft, der Rückstand mit Platinchlorid gefällt. Nach mehrfachem Einengen wurden die Platinniederschläge auf gewogenem Filter gesammelt, mit Alkoholäther gewaschen, getrocknet und geglüht. Aus der Menge des Platinsalmiaks ( $\text{PtCl}_6[\text{NH}_4]_2$ ) wurde die Gesamtmenge des Ammoniaks berechnet. Die Bestimmung des metallischen Platins erfolgte zu dem Zwecke, die Zusammensetzung des Niederschlages als Platindoppelsalz des Ammoniaks unzweifelhaft festzustellen.

Der Versuch ergab, dass das Glycocoll bei längerer Einwirkung von starker Lauge nur eine sehr geringe Spaltung in Ammoniak und Essigsäure erfährt. Zum Nachweise der Essigsäure wurde folgender Weg eingeschlagen: der Rückstand von der Kjeldahl-Destillation wurde mit Schwefelsäure übersättigt, zweimal mit Wasserdampf destillirt, mit Calciumcarbonat gekocht, heiss vom Calciumcarbonat filtrirt, eingedampft. Der Rückstand wurde im Toluolbade bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, mit Salpetersäure quantitativ in den Platintiegel gespült und geglüht.

---

<sup>1)</sup> Ueber die Oxydation der Hippursäure zu Harnstoff. Von Adolf Jolles. Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XXXIII, S. 2834.

**Beleg-Analyse.**

**I. Ammoniak.**

Verwendet 0,2616 g Glycocoll.

Filterglas ohne Pt-Salz	=	32,6393 g
"    mit    "	=	32,7053 "
		<hr/>
		0,0628 g Niederschlag.

Platintiegel ohne:	9,9539 g
"    mit:	9,9771 "

0,0232 g Platin, entsprechend 0,00405 g Ammoniak.

**II. Essigsäure.**

Schaale ohne Ca-Salz:	31,2684 g
"    mit    "	31,3044 "

0,0360 g Ca-Salz, entsprechend 0,0273 g Essigsäure.

Tiegel ohne	=	23,4101 g
"    + CaO	=	23,4226 "

0,0125 g CaO = 34,71% des Salzes.

CaO für essigsauren Kalk berechnet . . . . . 35,44%

CaO gefunden . . . . . 34,71%.

Ein interessantes Verhalten zeigt Glycocoll gegenüber Bromlauge. Es nimmt Brom auf, wahrscheinlich unter Bildung eines Additionsproduktes. Stickstoff wird hierbei im Gegensatz zu Harnstoff, Ammoniak und Säureamiden nur in Spuren entwickelt. Nichtsdestoweniger muss eine ziemlich tiefgreifende Veränderung durch die Bromlauge eingetreten sein, indem nach Vertreiben des überschüssigen Broms mit Salzsäure der gesammte Stickstoff in einem mit Phosphorwolframsäure fällbaren Körper sich wiederfindet, während ja unverändertes Glycocoll bekanntlich durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt wird.

Dieses Verhalten kann jedenfalls dazu benützt werden, um Glycocoll neben Harnstoff, Ammoniak und nicht in Ammoniak zerfallenden Körpern nachzuweisen, indem diese Körper durch Bromlauge ihren ganzen Stickstoff abgeben.

Der im Phosphorwolframsäureniederschlag enthaltene Stickstoff lässt sich durch Lauge zum grossen Theile in Form von Ammoniak frei machen. Zu diesem Zwecke wurde der Nieder-

schlag quantitativ in den Kolben des Kjeldahl-Destillationsapparates gebracht, mit Kalilauge (1:1) in starkem Ueberschusse versetzt und in verdünnte Salzsäure destillirt. Der Inhalt der Vorlage wurde quantitativ in eine Glasschaale gewaschen, zur Trockene verdampft, mit etwas Wasser aufgenommen und mit einer stark concentrirten Platinchloridlösung versetzt, etwas eingeeengt und 24 Stunden stehen gelassen. Langsam bildet sich ein grosskrystallinischer Niederschlag. Dieser wird auf ein bei 100° getrocknetes und gewogenes Filter gebracht, dieses mit Alkohol und Aether gewaschen und wieder eingeeengt, mit Platinchlorid versetzt und 24 Stunden stehen gelassen — es bildet sich ein neuer Niederschlag. Dieser wird wieder wie oben filtrirt, und das Filtrat zum dritten Male gefällt, wobei noch ein minimaler Niederschlag entsteht.

Wie die Beleganalysen zeigen, ergab die Platinbestimmung, dass die Base  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ist. Die Ammoniakbildung beginnt schon beim Entfernen des überschüssigen Broms durch Kochen mit Salzsäure, indem in diesem Stadium Nessler'sches Reagens eine stark positive Reaction ergab. Ueber die intermediär gebildeten Produkte lassen sich derzeit keine auf Experimente gestützte Angaben machen.

Einen Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen dieser Reaction dürfte die Beobachtung ergeben, dass nach dem Abdestilliren des Ammoniaks mit Kali erhebliche Mengen von Ameisensäure constatirt wurden.

Der hierbei eingehaltene Vorgang war folgender:

Der Rückstand von der Kjeldahl-Destillation wurde quantitativ in den Kolben eines Destillationsapparates für Wasserdampfstrom gebracht, der vorher auf dichten Schluss geprüft wurde. Nach Uebersättigen mit Schwefelsäure, wobei Aufbrausen eintritt, wurde destillirt. Das Destillat reagirt schwach sauer. Die Destillation wurde so lange fortgesetzt, bis das Uebergehende nicht mehr sauer reagirte. Es wurde noch einmal mit Wasserdampf destillirt, um von übergespitzten Spuren Schwefelsäure zu reinigen, mit kohlensaurem Kalk gekocht, heiss vom kohlensauren Kalk filtrirt, eingedampft und im Toluolbad getrocknet. Das Salz wurde mit  $\text{HNO}_3$  gelöst,

quantitativ in den Platintiegel gebracht, abgedampft, gekühlt, CaO gewogen. In einer zweiten Probe wurde die organische Säure freigemacht, mit Silbernitratlösung versetzt und erwärmt, es scheidet sich Silber ab, charakteristisch für Ameisensäure. Das Auftreten der Ameisensäure und des Ammoniaks spricht einigermassen für die vorübergehende Anwesenheit von Cyanwasserstoff.

### Beleg-Analysen.

I. Phosphorwolframsäureniederschlag von 0,5163 g reinem Glycocoll wird quantitativ in den Kolben des Kjeldahl-Apparates gebracht; ganze Behandlung wie früher.

Filterglas ohne Pt-Salz . . . .	48,0216 g
» mit » . . . .	48,6320 »
	<hr/>
	0,6104 g

Der Platindoppelsalzniederschlag wurde durch wiederholte Fällung quantitativ gesammelt, steht also im quantitativen Verhältnisse zum Ausgangsglycocoll.

Tiegel ohne . . . . .	15,4562 g
» mit . . . . .	15,7236 »
	<hr/>
	0,2674 » Pt,
	entsprechend 0,0967 g Ammoniak.
Gefunden . . . . .	Pt 43,87 %
Theoretisch für Ammoniumplatinchlorid . . .	» 44,09 »
	<hr/>
Differenz . . . . .	0,22 %.

II. Rückstand von der Kjeldahl-Destillation; Bestimmung des Kalksalzes.

Schale ohne Salz . . . . .	29,5095 g
» mit » . . . . .	29,7712 »
	<hr/>
	0,2617 g Salz.
Platintiegel leer . . . . .	23,4084 »
» mit CaO . . . . .	23,5140 »
	<hr/>
	0,1106 g CaO
	d. h. 42,26 % CaO des Salzes.
Theoretisch für ameisen-sauren Kalk $\left( \text{Ca} \begin{smallmatrix} \text{OOCH} \\ \text{OOCH} \end{smallmatrix} \right)$ . .	43,08 %
gefunden . . . . .	» 42,16 »
	<hr/>
Differenz . . . . .	0,08 %.

III. Phosphorwolframsäureeisenrath von 0,2314 g Glycocoll wurde der Kjeldahl-Destillation unterworfen.

Verbraucht: 16,2 ccm. Lauge, entsprechend 18,53 % N.  
(Titer: 123,55 ccm. Säure = 132,24 ccm. Lauge = 351 mg N.)  
Vorhanden . . . . . 18,66 % N  
gefunden . . . . . 18,53 „ „

Die interessante Beobachtung, dass Glycocoll bei dem beschriebenen Verfahren quantitativ durch Phosphorwolframsäure fällbar und zum Theil in Ameisensäure überführbar ist, legte mir den Gedanken nahe, die Diamidosäuren derselben Behandlung zu unterziehen, um eventuell eine quantitative Trennung oder wenigstens eine qualitative Differenzirung der Mono- und Diamidosäuren ausarbeiten zu können. In Folge der grossen Zeitinanspruchnahme, welche die Herstellung absolut reiner Diamidosäuren beansprucht, habe ich vorläufig von dieser Arbeit Abstand nehmen müssen.

---

### **Berichtigung.**

Von

**WL. Gulewitsch.**

In Band XXX, Seite 531, Zeile 10 von unten lies  
«das die Guanidingruppe enthaltende Derivat»  
statt: «Das Guanidinderivat».

## Zur Chemie der Mucine.

Von

P. A. Levene.

---

(Aus der physiologisch-chemischen Abtheilung des Pathologischen Instituts der  
New-Yorker Staatskrankenhäuser.)

(Der Redaction zugegangen am 12. October 1900.)

---

Gegenwärtig werden die Mucine als Verbindungen von Eiweissstoffen mit Kohlenhydraten betrachtet. Diese Annahme beruht auf der Thatsache, dass alle Mucine und verwandte Verbindungen bei längerer Behandlung mit verdünnten Mineralsäuren Substanzen geben, die Fehling's Lösung ebenso reduciren wie Glucose. Die wahre Natur dieser Substanzen blieb jedoch den ersten mit Mucin Arbeitenden unbekannt.

Der erste erfolgreiche Versuch, ein reines Kohlenhydrat zu erhalten, wurde in Hoppe-Seyler's Laboratorium gemacht. Landwehr berichtete, dass er aus verschiedenen Mucinen eine gummiähnliche Substanz erhielt, die er thierisches Gummi nannte. Er betrachtete jedoch Mucin nicht als eine molekulare Verbindung von Eiweissstoffen und thierischem Gummi; seiner Meinung nach waren die Mucine nur eine Mischung der zwei Substanzen, doch wurde diese Ansicht später von ihm geändert. Nach Landwehr suchte fast jeder an dieser Aufgabe arbeitende Forscher nach demselben thierischen Gummi und viele behaupteten, es gefunden zu haben, dagegen gelang es Hammarsten nur einmal, aus Mucin eine stickstofffreie Substanz zu erhalten, welche nach dem Erhitzen mit Mineralsäuren fähig war, eine alkalische Kupferlösung zu reduciren. Löbisch behauptet, dass er, nach Landwehr's Angaben arbeitend, dasselbe thierische Gummi vom Mucinbindegewebe erhalten habe.

Eine neue Reihe von Untersuchungen, die ganze Frage vom thierischen Gummi umfassend, wurde ganz unlängst von Folin in Hammarsten's Laboratorium unternommen. Der letztere bezweifelte aus gewissen Gründen die Richtigkeit der Landwehr'schen Schlüsse. Er hielt sich so nahe als mög-

nen an die Vorschriften Landweins, doch waren die Substanzen, die er auf diese Weise erhielt, niemals frei von Eiweissstoffen. Statt thierischen Gummis erhielt er eine Mucinalbumose. Die meisten Anderen forschten nur nach der Zusammensetzung der verschiedenen Mucine als solcher oder nach den Kohlenhydraten, die durch Erhitzen der Mucine mit verdünnten Mineralsalzen entstanden.

In dieser Hinsicht sind von grosser Wichtigkeit die Arbeiten von F. Müller und seinem Schüler John Seemann, sowie die Arbeit von Leathes. Müller und Seemann erhielten aus Mucinen eine krystallinische Substanz mit allen Eigenschaften des Glycosamins, Leathes aus Mucoid eine Substanz, die der Formel eines reducirten Chondrosins entsprach. Die letzte Arbeit erschien, nachdem ich meine vorläufige Mittheilung vor der Chemischen Gesellschaft zu New-York gemacht hatte.

Alle Mucine weisen eine Eigenschaft auf, welcher bis jetzt nicht genügende Aufmerksamkeit geschenkt worden ist; sie besitzen nämlich sehr ausgesprochen die Natur einer Säure, welche deutlicher ist als bei irgend einem einfachen Eiweissstoffe. Zur Erklärung dieser Thatsache kann man von zwei Ueberlegungen ausgehen: Erstens kann die Substanz, welche nach dem Erhitzen mit Mineralsäuren Kupfer reducirt, ein Säurederivat eines Kohlenhydrates sein oder zweitens kann das Mucinmolekül ausser Eiweiss und Kohlenhydrat auch noch eine Säure enthalten. Loebisch hatte ebenfalls schon die Beobachtung gemacht, dass sein thierisches Gummi Carbonate zersetzte, und Hammarsten gab an, dass er aus Mucinen eine Substanz mit Säureeigenschaften erhalten konnte.

Der Zweck dieser Arbeit war ein gründliches Studium des Säuretheiles des Mucinmoleküls, meine ersten Untersuchungen machte ich an Tendomucin nach der Methode von Chittenden und Gies. Das reine Mucin wurde in einer 10%igen Lösung von Kochsalz aufgenommen, eine Stunde auf dem Wasserbade digerirt und mit Alkohol niedergeschlagen. Dieser Niederschlag alsdann 24—48 Stunden mit einer 2%igen Lösung von Aetznatron behandelt, die

Lösung erst mit Essigsäure abgestumpft, bis sie schwach alkalisch blieb, dann gab man Pikrinsäure in starkem Ueberschuss dazu und machte sie endlich durch Essigsäure stark sauer.

Die Lösung wurde nun filtrirt und das Filtrat mit 3 bis 4 Volumen Alkohol vermischt, worauf sich ein weisser Niederschlag bildete. Die anhaftende Pikrinsäure kann leicht durch Alkohol und Aether beseitigt werden. Der Niederschlag ist in den meisten Fällen biuretfrei. Er wurde gewöhnlich wieder in Wasser aufgelöst, mit Aetznatron alkalisch gemacht und mit Alkohol wieder niedergeschlagen. Dieser Process wurde gewöhnlich 3—4 Mal wiederholt, selbst in Fällen, wo der erste Niederschlag nicht vollständig biuretfrei war, erreichte man das erwünschte Resultat nach ein- oder zweimaliger Behandlung mit Alkohol.

### Eigenschaften.

Die Substanz zeichnet sich durch folgende Eigenschaften aus: Löslich in Wasser mit saurer Reaction, unlöslich in Alkohol und Aether. Die wässrige Lösung bildet bei Abwesenheit von Mineralsalzen auf Zugabe von Alkohol und selbst von Alkohol und Aether einen sehr dicken gallertartigen Niederschlag; bei Gegenwart von Mineralsalzen besteht der Niederschlag aus weissen Flocken. Die Lösung der Substanz in Wasser schlägt Albumosen in einer sauren Lösung nieder. Die Substanz enthielt Stickstoff und Schwefel, gab aber keine der Eiweissfarbenreactionen; mit verdünnter Salzsäure gekocht, reducirte sie Fehling's Lösung.

Die Lösung der Substanz blieb bei Zugabe von Salzsäure und Chlorbaryum vollständig klar, aber beim Kochen bildete sich ein weisser Niederschlag. Wird die Substanz in einer 3%igen Lösung von Salpeter- oder Schwefelsäure auf dem Wasserbad oder auf freier Flamme erhitzt, so ist durch Zugabe von Alkohol kein Niederschlag mehr erhältlich, es bildet sich aber wohl ein solcher, wenn man Alkohol und Aether hinzufügt. Dieser Niederschlag wurde mit einer Lösung von Baryumhydrat behandelt und filtrirt. Bei Erwärmung dieses



Filtrates bildete sich ein orangefarbiger Niederschlag, der charakteristisch für Glykuronsäure ist.

Es wurde ferner festgestellt, dass die Substanz bei Erwärmen mit 5%iger  $H_2SO_4$  Essigsäure liefert.

Ungefähr 5 g von dem Baryumsalz der Substanz wurden in Wasser aufgelöst und verdünnte Schwefelsäure hinzugefügt, bis die Lösung sauer auf Methylorange reagierte, hierauf wurde sie mit Alkohol und Aether behandelt.

Der hierdurch entstehende Niederschlag wurde filtrirt, mit Alkohol und Aether gewaschen, von Neuem aufgelöst und wieder präcipitirt. Schliesslich wurde er in 5%iger  $H_2SO_4$  aufgelöst, erhitzt und die so gebildete flüchtige Säure mit Wasserdampf destillirt und in einer  $n_{10}$ -Lösung von NaOH aufgefangen. Nach Beendigung des Processes wurde die letztere Lösung neutralisirt, bis zum Trockenwerden verdunstet, in ein wenig Wasser aufgelöst und nach Zugabe von etwas Alkohol und Schwefelsäure erhitzt. Es bildete sich Essigester.

Die Natron-, Baryum- und Kupfersalze der Substanz sind löslich in Wasser und unlöslich in Alkohol.

Alle diese Eigenschaften weisen auf Chondroitin-Schwefelsäure und es war deshalb nöthig, festzustellen, in welcher Beziehung die Substanz zu der letzteren steht. Zu diesem Zwecke wurden mehrere Salze analysirt.

#### Analyse der Salze.

Das Natronsalz wurde erhalten durch Auflösung der ursprünglichen Substanz in Aetznatron und Fällung mit Alkohol.

Dieser Process muss mehrere Male wiederholt werden. Der Stickstoff wurde nach Kjeldahl's Methode bestimmt.

0,2673 g der Substanz in 15 ccm.  $H_2SO_4$  + 8 g  $K_2SO_4$  aufgelöst, zu 15 ccm.  $n_{10}$ - $H_2SO_4$  musste 9,2  $n_{10}$ -NaOH hinzugefügt werden;  $N = 0,00762$  g = 2,70%, Na-freie Substanz  $N = 3,95\%$ .

Schwefel: 0,137 g der Substanz wurde aufgelöst in einer 1%igen Lösung von HCl,  $BaCl_2$  hinzugefügt, ohne dass ein Niederschlag entstand; die Lösung dann eine Stunde über offener Flamme gekocht und über Nacht stehen gelassen.  $BaSO_4 = 0,032$ ;  $S = 3,29\%$ .

Natron: 0,1743 g der Substanz gegläht, dann einige Tropfen  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzugefügt und das Glühen fortgesetzt.  $\text{Na}_2\text{SO}_4 = 0,1103$  g;  $\text{Na} = 20,4\%$ .

#### Baryumsalz.

Die wässrige Lösung der Substanz wurde mit Barytwasser behandelt und dann ein ebenso grosses Volumen Alkohol hinzugefügt. Nachdem der Niederschlag mittelst einer Saugpumpe filtrirt worden, wurde er wieder in Wasser aufgelöst, Barytwasser dazu gegeben und wie vorher behandelt. Der Process wurde dreimal wiederholt. Das Salz wurde dann wiederholt in Wasser aufgelöst und durch Alkohol niedergeschlagen. Schliesslich wurde es mit Alkohol und Aether gewaschen, in vacuo bei ungefähr  $100^\circ \text{C}$ . getrocknet.

Stickstoff bestimmt wie schon erwähnt:

0,3902 g haben zur Neutralisation nöthig 7,4 ccm. von  $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{N} = 2,65\%$ .

Schwefelbestimmung: 0,3178 g von der Substanz wurden in Wasser aufgelöst, wobei die Lösung ganz klar blieb, dann wurde Salzsäure hinzugefügt, bis eine 1%ige Lösung entstand, welche eine Stunde lang gekocht wurde.  $\text{BaSO}_4 = 0,058$ ,  $\text{S} = 2,51\%$ .

Baryumbestimmung: Zu dem vorigen Filtrate von  $\text{BaSO}_4$  fügte man  $\text{H}_2\text{SO}_4$  hinzu, bis sich kein Niederschlag mehr bildete. Das dadurch entstandene  $\text{BaSO}_4$  wurde mit dem früheren vereinigt und zusammen gewogen.  $\text{BaSO}_4 = 0,1262$ ,  $\text{Ba} = 23,35\%$ . Kohlenstoff und Wasserstoff. 0,1575 g der Substanz mit Kaliumbichromat ergaben  $\text{CO}_2 = 0,1715$ ,  $\text{C} = 29,60\%$ ;  $\text{H}_2\text{O} = 0,7005$ ,  $\text{H} = 4,94\%$ .

#### Kupfersalz.

1. Eine Lösung der Säure und des Natronsalzes der letzteren wurde mit einer alkoholischen Lösung von Kupferacetat niedergeschlagen. Der Niederschlag wurde hierauf so lange mit Alkohol gewaschen, bis sich kein Kupfer mehr darin auflöste, hierauf wieder aufgelöst und von Neuem durch Alkohol niedergeschlagen. Mehrmalige Wiederholung dieses Processes.

0,358 g dieser Substanz wurden dann in einer 1%igen Lösung von HCl aufgelöst und mit  $H_2S$  behandelt. Das Kupfer wog als  $CuO = 0,046$ ,  $Cu = 9,97$ .

2. Eine Lösung des Natronsalzes der Säure wurde mit Kupferchlorid behandelt, bis sie anfang, auf Congopapier zu reagiren. Das Kupfersalz wurde dann durch Alkohol niedergeschlagen und der Niederschlag mit Alkohol gewaschen, bis letzterer weder Kupfer noch Chlor enthielt. Der Niederschlag wurde dann wieder aufgelöst und von Neuem präcipitirt, bis die Filtrate weder Cu noch Chloride enthielten.

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl wie oben:

0,2358 g der Substanz neutralisiren 5,6 ccm.  $n/10-H_2SO_4$ ,  
 $N = 3,39\%$ .

0,2500 g der Substanz neutralisiren 6,1 ccm.  $n/10-H_2SO_4$ ,  
 $N = 3,41\%$ .

Schwefelbestimmung:

0,151 g der Substanz wurden in einer 1%igen Lösung von Chlorwasserstoffsäure aufgelöst und eine Lösung von  $BaCl_2$  hinzugefügt. Die Lösung wird hierauf eine Stunde gekocht.  $BaSO_4 = 0,0275$ ,  $S = 2,41\%$ .

Kupferbestimmung:

0,444 g des Salzes wurden in einer 1%igen Lösung von Salzsäure aufgelöst, die Lösung ungefähr eine Stunde gekocht und dann mit  $H_2S$  behandelt.  $CuO = 0,0695$ ,  $Cu = 12,46\%$ .

3. Präparat wie 2. — Getrocknet in vacuo bei einer Temperatur von  $70^\circ$ .

Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl:

0,389 g des Salzes neutralisiren 7,5 ccm.  $n/10-H_2SO_4$ ,  
 $N = 2,95\%$ .

Schwefelbestimmung:

0,3705 g der Substanz in einer 1%igen Lösung von Salzsäure aufgelöst, eine Lösung von  $BaCl_2$  hinzugefügt und dann eine Stunde gekocht.  $Ba_2SO_4 = 0,1010$  g,  $S = 3,82\%$ .

Kupferbestimmung:

Das Filtrat von der  $BaSO_4$ -Lösung mit  $H_2S$  behandelt.  $CuO = 0,0757$ ,  $Cu = 16,44\%$ .

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen :

1. 0,1663 g der Substanz ergaben bei Verbrennung  $\text{CO}_2$  — 0,1606 g, C = 27,36 und  $\text{H}_2\text{O}$  — 0,747, H = 4,98%.

2. 0,1958 g der Substanz gaben  $\text{CO}_2$  — 0,1925 g, C = 27,74 und  $\text{H}_2\text{O}$  — 0,0888, H = 5,11%.

3. 0,1811 g der Substanz gaben  $\text{CO}_2$  — 0,1798 g und  $\text{H}_2\text{O}$  — 0,0800 g, C = 27,25, H = 4,91%.

4. Präparirt wie 2 und 3. — Bei einer Temperatur von 80° C. in vacuo getrocknet.

Stickstoff, bestimmt wie oben :

0,381 g neutralisiren 8,5 ccm.  $\text{n}/_{10}\text{-H}_2\text{SO}_4$ , N = 3,12%.

Schwefelbestimmung:

0,250 g der Substanz in einer 2%igen Lösung von Salzsäure aufgelöst, eine Lösung von  $\text{BaCl}_2$  dazugegeben und damit eine Stunde gekocht.  $\text{BaSO}_4$  = 0,009, S = 3,88%.

Kupferbestimmung:

0,500 g mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat geschmolzen,  $\text{CuO}$  = 0,0523, Ca = 8,34%.

Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen:

1. 0,1440 g der Substanz gaben  $\text{CO}_2$  — 0,1592 g und  $\text{H}_2\text{O}$  — 0,0704 g, C = 30,20, H = 5,43%.

2. 0,1945 g gaben  $\text{CO}_2$  — 0,2163 g und  $\text{H}_2\text{O}$  — 0,0951 g, C = 29,86, H 5,42%.

3. 0,1341 g gaben  $\text{CO}_2$  — 0,1471 g und  $\text{H}_2\text{O}$  — 0,0630 g, C = 29,91, H = 5,29%.

Ein Vergleich aller Analysen zeigt, dass die analysirten Proben in ihrer Zusammenstellung variiren, wie aus der folgenden Tabelle leicht ersichtlich ist.

	C	H	N	S	Base
Na-Salz . . . . .	—	—	2,70	3,29	20,40
Baryumsalz . . . . .	29,96	4,94	2,65	2,51	23,31
Kupfersalz . . . . .	—	—	—	—	9,97
„ . . . . .	—	—	3,40	2,41	12,46
„ . . . . .	27,45	5,00	2,96	3,82	16,44
„ . . . . .	29,99	5,35	3,12	3,88	8,34

Rest ohne die Base und das  $\text{SO}_3$ , so ergibt sich folgende Tabelle:

	C	H	N	O
Natriumsalz . . . . .	—	—	3,95	—
Baryumsalz . . . . .	41,66	6,97	3,71	47,66
Kupfersalz . . . . .	—	—	—	—
„ . . . . .	—	—	4,18	—
„ . . . . .	36,55	6,65	4,04	52,83
„ . . . . .	37,50	6,77	3,66	52,07

Auch der organische Rest variirt in seiner Zusammensetzung, andererseits unterscheidet er sich von Chondroitin, das folgende Zusammensetzung hat:

C	H	N	O
54,90%	5,61%	2,91%	46,58%.

Diese Unterschiede können aber leicht erklärt werden, wenn wir annehmen, dass die chondroitinschwefelsauren Salze mit Glycosamin in verschiedenem Verhältniss vereinigt waren.

Man könnte dann die folgenden Formeln annehmen:

Für das Baryumsalz:

Befund:	Berechnung:
	$(7\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_{14}\text{Ba}_2\text{SO}_3 + \text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_{14} + 10\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_6 + 14\text{H}_2\text{O})$
C 29,96%	29,49%
H 4,94%	4,14%
N 2,65%	3,01%
S 2,57%	2,65%
Ba 23,31%	22,92%.

Für das Kupfersalz 3:

Befund:	Berechnung:
	$(2\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_{14}\text{Cu}_2\text{SO}_3 + \text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_6 \cdot \text{CuSO}_4 + 3\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_6 + 18\text{H}_2\text{O})$
C 27,45%	27,05%
H 5,00%	4,79%
N 2,96%	3,14%
S 3,82%	3,59%
Cu 16,44%	16,49%.

Für das Kupfersalz 4:

	Befund:	Berechnung:
		$(2\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_{14}\text{Cu}_2\text{SO}_4 + 2\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_{14}\text{CuSO}_4 +$ $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_6 \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 + 5\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_6 + 28\text{H}_2\text{O})$
C	29,99%	30,27%
H	5,35%	5,38%
N	3,12%	3,27%
S	3,88%	3,74%
Cu	8,34%	8,83%

Aber die analytischen Befunde schliessen auch nicht die Möglichkeit aus, dass die Substanz überhaupt keine Chondroitinschwefelsäure ist, dass sie nämlich mehr Glycosamin enthält, wie die Chondroitinschwefelsäure.

Deshalb wurde versucht, das Chondrosin aus der Substanz darzustellen. Die Substanz wurde in einer 3%igen Lösung von Salpetersäure aufgelöst und über einer offenen Flamme gekocht, bis sich bei Zugabe von Alkohol kein Niederschlag mehr zeigte. Die Lösung wurde dann mittelst Alkohol-äther niedergeschlagen.

Es wurden einige Gramm vom Baryumsalz mit Schwefelsäure vom Baryum befreit, dann mit Alkohol und Aether niedergeschlagen, dieser Niederschlag in 3%iger Salpetersäure aufgelöst und über einer freien Flamme erhitzt, die Flüssigkeit dann mit Alkohol und Aether behandelt, wobei sich ein Niederschlag bildete, der in vacuo getrocknet wurde.

Eine Stickstoffbestimmung wurde nach Kjeldahl ausgeführt.

0,2830 g Substanz sättigten 7,60 n/10- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; die Substanz enthielt 5,05% Asche; der Stickstoff für die aschefreie Substanz = 3,96%.

Also auch dieses Resultat macht die Annahme, dass die Substanz eine Chondroitinschwefelsäure ist, wahrscheinlich. Doch sind meine Versuche zur völligen Feststellung der Formel noch nicht ganz vollendet. Ich hoffe, deren Resultate in einer zweiten Abhandlung mitzutheilen.

Die nächste Frage war, ob diese gepaarte Schwefelsäure einen integrierenden Theil des Mucinmoleküls bildet. Etwas von dem, wie früher erwähnt, bereiteten Mucin wurde

behandelt, um die Säure zu isoliren; es ergaben sich jedoch bloss Spuren. Der Rückstand wurde gewaschen, wieder aufgelöst und wieder in derselben Weise behandelt, mit dem nämlichen Resultat. Der Rückstand wurde hierauf gründlich mit destillirtem Wasser ausgewaschen, bis die ganze Substanz durchgewaschen war, und 24 Stunden in 200 ccm. einer 2%igen Lösung von Aetznatron gelassen. Er wurde dann, wie oben, bezüglich Isolirung der Substanz behandelt. Das Resultat fiel sehr befriedigend aus. Die Säure kann vom Mucin getrennt werden, auch indem man das letztere auf dem Wasserbade unter Zugabe einiger Tropfen Salzsäure digerirt. Zersetzt man das Mucin mit Pepsinsalzsäure, so erhält man schon nach einer Digerirung von 24 Stunden dieselbe gepaarte Schwefelsäure. Nach einer dreiwöchigen Verdauung blieb jedoch ein Theil des Mucins ungelöst. Die Erforschung der Natur dieses Rückstandes sowie der hierbei stattfindenden Proteolyse ist bis jetzt noch nicht vollendet.

Die nächste Aufgabe war, festzustellen, ob nur Tendo-mucin Schwefelsäure in esterartiger Bindung enthält, oder ob alle Mucine und Mucoide dieselbe Zusammensetzung haben. Die folgenden Untersuchungen beschränken sich auf das submaxillare Mucin und die Mucoidsubstanz eines Carcinoms. Das submaxillare Mucin war nach folgender Methode behandelt: Die Drüsen wurden gleich nach dem Tode des Thieres entfernt, in Aether gelegt und ins Laboratorium gebracht. Hier wurden sie in einer Maschine fein zerhackt, worauf man sie während 24 Stunden in destillirtem Wasser maceriren liess, sie aber durch Zugabe von Chloroform in grossen Quantitäten vor Zersetzung schützte. Das Extract wurde dann durch Gaze filtrirt, hierauf in Scheidetrichtern gut mit Aether durchgeschüttelt und 24 Stunden darin stehen gelassen. Durch diesen Process kamen alle Gewebetheile und das Fett an die Oberfläche und der untere Theil blieb vollständig klar. Dieser wurde filtrirt und nach Hammarsten's Methode auf Mucin behandelt. Die Substanz wurde zweimal wieder aufgelöst und niedergeschlagen. Dieses Mucin wurde

auf dieselbe Weise wie das Tendomucin auf Aetherschwefelsäure geprüft. Statt dieses letzteren erhielt man aber eine Substanz, die der von Folin im Hammarsten'schen Laboratorium erhaltenen glich und welche dieser Mucinalbumose nannte.

Nach einigen vergeblichen Versuchen, eine eiweissfreie Säure zu erhalten, erreichte ich zuletzt das gewünschte Resultat auf folgende Weise. Das Mucin wurde eine Stunde auf einem Wasserbade mit 0,1%iger Salzsäure digerirt. Nachdem die Lösung mit Aetznatronlösung neutralisirt worden, wurde sie mit grossen Quantitäten Alkohol behandelt. Die dadurch gebildeten Niederschläge wurden in 5%iger Aetznatronlösung über Nacht stehen gelassen. Hierauf wurden sie mit Brücke's Reagens und Salzsäure behandelt. Das Filtrat ergab bei Zugabe von Alkohol und Aether keinen Niederschlag. Wurde jedoch die Lösung vor der Zugabe von Alkohol mit einer genügenden Quantität Aetznatronlösung vermischt, um sie neutral zu machen, so bildete sich ein gelblicher Niederschlag, der grosse Aehnlichkeit mit dem Natronsalz der Aetherschwefelsäure hatte. Der Niederschlag wurde noch einmal in einer verdünnten Lösung von Natronhydrat aufgelöst, filtrirt und mittels Alkohols niedergeschlagen. Die so entstandene Substanz schlug eine saure Lösung von Albumosen nieder, reducirte Fehling's Lösung, wenn sie zuerst mit Salzsäure gekocht wurde, und ergab nach dem Erhitzen auf Zugabe von Salzsäure und Baryumchlorid einen Niederschlag. Dieser war stickstoffhaltig und gab keine Biuretreaction. Ich hatte nicht genug Material für die Chondroitinprobe.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass das submaxillare Mucin in seinem Moleküle eine Substanz enthält, welche entweder Chondroitinschwefelsäure oder nahe damit verwandt ist. Die Versuche mit Muroid aus Carcinom, nach derselben Methode wie das submaxillare Mucin dargestellt, weisen auf eine ähnliche Substanz hin.



- Chittenden und Gies, Journal of Exper. Medicine, Vol. I.  
Folin, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXIII.  
Hammarsten, Pflüger's Arch. Bd. 36.  
Landwehr, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. V, VI, VIII, IX. Pflüger's Arch. Bd. 39.  
Levene, Journal of the American Chemical Society, Vol. XXII, Nr. 2.  
Leathes, Arch. f. Exp. Path. u. Pharm. Bd. 43.  
Loebist, Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. X.  
Müller, Sitzungsber. d. Gesellsch. z. Beförderung d. gesammten Naturwissenschaft. zu Marburg, 1896, Nr. 6, 53—76. Citirt nach Maly's Jahresbericht. Bd. 26. Ibid. 1898, Nr. 6, auch nach Maly's Jahresbericht Bd. 28.  
Panzer, Zeitschr. f. Physiol. Chem. Bd. XXVIII.  
Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 28.  
John Seemann, Inaug.-Diss. Marburg, 1898, Maly's Jahresber. Bd. 28.
-

## **Erwiderung.**

Von

**Ivar Bang.**

---

(Der Redaction zugegangen am 8. November 1900.)

---

Zu den Bemerkungen des Herrn Prof. Kossel<sup>1)</sup> gegen meine Arbeit über das Nucleohiston habe ich Folgendes anzuführen.

Wenn Herr Prof. Kossel meint, dass ich die Frage nach der Existenz des Nucleohistons mit der Frage nach dem präformirten Vorkommen in der Zelle vermenget habe, kann dies nur auf einem Missverständniss beruhen, da ich nur Wasserextracte (und physiologische Kochsalzextracte) aus Thymus untersucht habe, ganz ebenso wie Lilienfeld. Ueber das Vorkommen der betreffenden Substanzen in der Zelle habe ich mich nicht geäußert. Im Gegensatz zu Lilienfeld, der behauptet, dass das Wasserextract aus Thymus einen Körper, das Nucleohiston, enthält, habe ich gefunden, dass hier mehrere verschiedene Substanzen vorkommen.

Wenn Herr Prof. Kossel behauptet, dass diese verschiedenen Substanzen die Componenten des Nucleohistons bilden, welche bei dem Lilienfeld'schen Verfahren, d. h. durch die Behandlung mit Essigsäure, zu diesem Körper zusammentreten, so steht dies erstens im Widerspruch zu Lilienfeld's Auffassung, welcher das Nucleohiston als einen präformirten Bestandtheil des Wasserextractes beschreibt (vide Bd. 18 diese Zeitschrift S. 478: «Schüttelt

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXX.

Lösung. Dies ist das Nucleohiston»). Zweitens enthält das Wasserextract nicht die Componenten des Nucleohistons. Diese sind nach Lilienfeld Histon und Leuconuclein und nicht, wie Kossel jetzt schreibt: Nucleinsäure, Nuclein und Histon (!) Nun enthält ja das Wasserextract Histon, aber kein Leuconuclein. Folglich kann auch nicht von einem «Zusammentreten» dieser Componenten zum Nucleohiston die Rede sein. Drittens kann man die Essigsäurefällung durch Lauge zu einer neutralen Lösung auflösen, aus welcher man ebenso wie aus dem Wasserextract durch Salze verschiedene Fractionen bekommen kann. Ich schliesse hieraus, dass die Substanzen des Wasserextractes nicht zu einem einheitlichen Körper, dem Nucleohiston, zusammentreten.

Dass das Nucleohiston sich als präformirter Körper nicht im Wasserextracte vorfinden kann, habe ich auch bewiesen. Ich habe nämlich gefunden, dass das Wasserextract ein Nucleoproteid enthält, welches durch Essigsäure niedergeschlagen werden kann. Dasselbe Nucleoproteid kann man auch durch 0,9%ige NaCl-Lösung extrahiren. Dass dies Nucleoproteid ein einheitlicher Körper ist, welcher nichts mit dem «Nucleohiston» zu thun hat, darüber kann wohl auch Herr Prof. Kossel nicht im Zweifel sein. Weiter habe ich aus dem Wasserextract allein durch 0,7—0,9% NaCl eine Fraction ausfällen können, welche kein Histon enthält. Diese Fraction geht aber auch in die Essigsäurefällung über. Wenn man nicht annehmen will, dass die Anwendung von 0,9%iger Kochsalzlösung eine chemische Verbindung von Histon mit der oder den Substanzen der erwähnten Fraction spaltet, so muss man zugestehen, dass auch diese Fraction sich als eine Verunreinigung des «Nucleohiston»-Niederschlages durch Essigsäure darstellt. Wenn Prof. Kossel auch nicht dem beistimmen will, dass das Histon sich im Wasserextracte als ein freier Körper befindet, was ich auch glaube bewiesen zu haben, so geht doch aus meinen Untersuchungen hervor: 1. Das sogenannte Nucleohiston kann unmöglich ein einheitlicher Körper sein.

2. Man kann nicht durch Lilienfeld's Verfahren einen solchen Körper darstellen. 3. Da man die eine Componente des Nucleohistons auf keine Weise darstellen kann, kann überhaupt kein Nucleohiston existiren.

Wenn Herr Prof. Kossel zum Schluss mir vorwirft, dass ich verschwiegen habe, dass bereits Lilienfeld das Nucleoproteid dargestellt und analysirt hat, so ist mir dies ganz unbegreiflich. Herr Prof. Kossel muss offenbar die nicht unwesentliche Thatsache übersehen haben, dass Lilienfeld's Nucleoproteid ganz unlöslich im Wasser ist, während mein Nucleoproteid im Wasser löslich ist. Ausserdem wird das Nucleoproteid Lilienfeld's durch 10%ige Kochsalzlösung extrahirt, während ich mein Nucleoproteid schon durch Wasser oder 0,7%ige Kochsalzlösung extrahiren kann.

Zuletzt kann ich zufügen, dass es nicht durch die Analysen Lilienfeld's so festgestellt ist, wie Prof. Kossel glaubt, «dass das Nucleohiston eine constante, durch Umfällung nicht zu ändernde Zusammensetzung hat». Halliburton hat nämlich ganz andere Phosphorwerthe als Lilienfeld gefunden. Auch hat er bei mehrfachen Lösungen und Fällungen des Nucleohistons sehr verschiedene Phosphorwerthe gefunden. Malengreau<sup>1)</sup> hat zwei verschiedene Nucleohistone beschrieben, wovon das eine 0,5% P, das andere aber 4,5% P enthielt. Obwohl Malengreau die Sachlage missverstanden hat, deutet doch seine Arbeit auf dasselbe, was ich gefunden habe. Endlich ist die Existenz des Nucleohistons nach Kossel's eigener Definition unmöglich. Das Nucleohiston ist nach Kossel eine abgesättigte salzartige Verbindung der sauren und basischen Bestandtheile der Thymuszelle. Da man nun hier mehrere verschiedene basische und saure Substanzen beschrieben hat (z. B. Histon und Parahiston), muss folglich nach Kossel das Nucleohiston mehrere oder alle diese enthalten. (Kossel hat schon zwei saure Componenten hervorgehoben.) Dann aber muss Kossel auch Lilienfeld's Begriff des Nucleohistons erheblich ändern. Wenn also Kossel schreibt: «Die

---

<sup>1)</sup> La Cellule, T. XVII.

des Herrn Bang gar nicht berührt,» will ich nur zufügen:  
Die Arbeiten Lilienfeld's werden schon durch die  
Vertheidigung Prof. Kossel's gegen mich sehr ernstlich  
berührt.

Von mehreren Seiten aufgefordert, habe ich mich dazu  
entschlossen, meine Studien über die Substanzen aus Thymus  
wenn möglich fortzusetzen.

---

### **Bemerkungen zu der Erwiderung des Herrn Bang.**

Von  
**A. Kossel.**

---

Die vorliegende Erwiderung des Herrn Bang enthält  
eine Wiederholung der früheren Behauptungen, ohne dass ein  
neues Beweismittel hinzugefügt wurde. Ich verzichte darauf,  
jetzt nochmals auf diese Frage einzugehen, will jedoch her-  
vorheben, dass der von mir angefochtene Ausspruch des  
Herrn Bang: «Es gibt kein Nucleohiston,» auch durch die  
inzwischen erschienenen Mittheilungen von Malengreau<sup>1)</sup> und  
von Huiskamp<sup>2)</sup> als unrichtig erwiesen wird.

---

<sup>1)</sup> La Cellule, T. XVII. S. 339.

<sup>2)</sup> Sitzungsberichte der Kgl. Akademie der Wissenschaften zu  
Amsterdam, 24. Nov. 1900.

# **Chemische und physiologische Studien über die Guanylsäure.**

Von  
**Ivar Bang.**

## **I. Theil. Chemische Studien.**

---

(Der Redaction zugegangen am 14. November 1900.)

---

Nach Kossel<sup>1)</sup> können wir die Nucleinsäuren in drei Gruppen zusammenfassen: erstens Thymonucleinsäuren, zweitens Inosinsäure und Guanylsäure und drittens Plasminsäure.

Die Thymusnucleinsäuren sind nun unter sich verschiedenartig. Hier finden wir die beiden Nucleinsäuren der Thymusdrüse, die Nucleinsäuren aus dem Sperma der Fische und die Hefenucleinsäure. Die Gruppe wird am besten dadurch charakterisirt, dass der Kern dieser Nucleinsäuren aus einer (oder mehreren) substituirten Phosphorsäure in Verbindung mit der basischen Substanz Thymin als Thyminsäure besteht. Die Gruppe besteht also aus Nucleinsäuren, die sicher nahe verwandt sind, und ist als eine wohl charakterisirte zu bezeichnen. Man muss deshalb Kossel beistimmen, wenn er die Gruppe der Thymonucleinsäuren aufstellt.

Dagegen kann der Verfasser Kossel nicht weiter folgen, wenn er die Inosinsäure und Guanylsäure zu einer Gruppe zusammenfasst. Dies werde ich unten näher begründen. Auch ist es nach den vorliegenden Untersuchungen nicht sicher oder wahrscheinlich, dass die Plasminsäure eine echte Nucleinsäure ist; die dritte Gruppe Kossel's ist deshalb vielleicht auch nicht aufrecht zu halten.

Unter den Thymonucleinsäuren ist am längsten die Hefe-

---

<sup>1)</sup> Liebreich's Encyklopädie, Bd. 3, cit. noch Ascoli.

Kossel studirt worden; in einer kurzen Mittheilung<sup>1)</sup> hat er seine Erfahrungen über sie veröffentlicht, während eine ausführliche Publication niemals erschienen ist. Kossel findet die Zusammensetzung einer Formel  $C_{17}H_{26}N_6P_2O_{14}$  od.  $C_{25}H_{36}N_9P_3O_{20}$  entsprechend. Von den Spaltungsprodukten wurden Phosphorsäure, Xanthinbasen und eine reducirende Substanz erkannt, eine genauere Untersuchung dieser reducirenden Substanz<sup>2)</sup> lehrte, dass sie aus einer Pentose und einer Hexose bestand. Dies wurde durch fractionirte Krystallisation nachgewiesen. Leider hat Kossel uns weiter nichts über diese Pentose mitgetheilt, eine Schmelzpunktbestimmung des Osazons angenommen, und doch haben mehrere Forscher vergebens Zuckerarten und besonders Pentosen aus Nucleinsäuren und Nucleoproteiden in Krystallen darzustellen versucht. Es ist deshalb schade, dass Kossel seine krystallisirte Pentose nicht näher beschrieben hat. Liebermann und v. Bitto<sup>3)</sup> haben später Einwände gegen die Existenz einer Pentose in der Hefenucleinsäure erhoben. In einer späteren Mittheilung<sup>4)</sup> hat auch Kossel seine Auffassung derart verändert, dass er jetzt die Zuckergruppe nicht mehr als einen Bestandtheil der Hefenucleinsäure ansieht, indessen dürfte doch nach den Untersuchungen von Herlant<sup>5)</sup> die Hefenucleinsäure dessenungeachtet eine Zuckergruppe enthalten.

Durch Alkalibehandlung konnte Kossel aus der Hefenucleinsäure mehrere neue Säuren darstellen, deren erste die Plasmensäure war, welche also damals ein Spaltungsprodukt war, jetzt aber als echte Nucleinsäure aufgestellt wird. Durch fortgesetzte Alkalibehandlung konnte man nach und nach alle organische Substanz abspalten und man bekam zuletzt eine anorganische Phosphorsäure, welche aber nicht eine gewöhnliche Metaphosphorsäure war, wie Kossel aus mehreren Reac-

---

1) Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abth. 1891.

2) Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abth. 1893.

3) Centralblatt f. Physiologie. 7. 1893.

4) Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abth. 1894.

5) Archiv f. exp. Path. u. Pharm. Bd. 44.

tionen bewiesen hat. Merkwürdiger Weise hat neulich Ascoli<sup>1)</sup> in Kossel's Laboratorium gefunden, dass doch eine gewöhnliche Metaphosphorsäure hier vorliegt. Kossel's Beweise haben also einer Kritik nicht Stand halten können.

In Verbindung mit der Hefenucleinsäure dürfte auch die Plasminsäure besprochen werden. Diese Säure, die Kossel also als ein Spaltungsprodukt der Hefenucleinsäure beschrieben hat, ist jetzt von ihm in die Reihe der Nucleinsäuren gehoben. Wenn man aber bedenkt, dass diese Säure durch Salzsäurebehandlung dargestellt wird, ist die Sache gar nicht so einfach. Miescher hat ja gefunden, dass die Nucleinsäuren ausserordentlich schnell und leicht von Salzsäure gespalten werden, und es ist deshalb zu befürchten, dass die Salzsäurebehandlung hier schaden kann, sodass die Plasminsäure nicht als eine Nucleinsäure, sondern als Spaltungsprodukt anzusehen ist. Ihr kolossaler Phosphorgehalt spricht entschieden dafür.

Eine andere, von Kossel studierte Nucleinsäure ist die sogenannte Adenylsäure, oder wie sie jetzt heisst, die Thymusnucleinsäure.

Durch Behandlung der Thymusdrüse mit Baryt konnte Kossel eine Nucleinsäure darstellen, welche nur eine Xanthinbase enthielt, nämlich Adenin. Davon der Name Adenylsäure.<sup>2)</sup> Die Adenylsäure war sehr leicht zu zerlegen. Man bekam auch hier mehrere neue Säuren, zuerst die Paranucleinsäure, dann die Thyminsäure, welche in Thymin und Phosphorsäure zerlegt werden konnte.

Leider waren auch diese Untersuchungen nicht besser begründet wie die vorigen, da eine neue Untersuchung auch von Kossel<sup>3)</sup> andere Resultate ergab. Die Adenylsäure enthielt nicht allein Adenin, sondern auch Guanin (und eine neue Base Cytosin), was Kossel merkwürdiger Weise bei seiner ersten Untersuchung nicht gefunden hatte. Ferner konnte Kossel seine Paranucleinsäure nicht wiederfinden. Die Para-

---

1) Zeitschrift f. phys. Chemie. Bd. XXVIII.

2) Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abth. 1894.

3) Zeitschrift f. phys. Chemie. Bd. XXII.



stanzen. Als ein neuer Bestandtheil der Thymusnucleinsäure wurde ein Kohlehydrat gefunden, welches aber nicht als Zucker abgespalten wird und das als Lävulinsäure erkannt werden konnte. Die Kohlehydratgruppe war also sehr eng in der Nucleinsäure gebunden. Der Verfasser kann nur seine Verwunderung hierüber aussprechen, da die Thymusnucleinsäure nach Kossel so leicht in ihre übrigen Componenten Adenin, Guanin, Thymin, Phosphorsäure u. s. w. zerfällt. Wozu kann denn eigentlich die Kohlehydratgruppe gehören? (Weitere Untersuchungen besonders über die Thyminsäure sind hier erforderlich.)

Nach den letzten Untersuchungen der Thymusnucleinsäure von Neumann<sup>1)</sup> lässt sich aus den Thymusnucleinsäuren doch ein Zwischenstadium zwischen Nucleinsäure und Thyminsäure aufstellen, das Neumann Nucleothyminsäure nennt.

Als Typus der Nucleinsäuren von Fischen können wir die von Miescher und Schmiedeberg<sup>2)</sup> studirte Nucleinsäure aus Lachssperma oder die Salmonnucleinsäure betrachten.

Die Zusammensetzung der Salmonnucleinsäure entspricht einer Formel  $C_{40}H_{56}N_{14}P_4O_{36}$ . Die Säure besteht aus Thyminsäure oder Nucleotinphosphorsäure, wie Schmiedeberg sie nennt, welche mit den Xanthinbasen Adenin und Guanin verbunden ist. Die Verbindung ist eine salz-, nicht esterartige. Dies meint Schmiedeberg dadurch bewiesen zu haben, dass er aus Mischungen von Salmonnucleinsäure und Xanthinbasen eine an Xanthinbasen reichere Substanz darstellen konnte, die sich ganz wie die Salmonnucleinsäure verhält. Wenn man ferner zur Thyminsäure Xanthinbasen setzt, so bekommt man eine Säure, die sich wie die Salmonnucleinsäure verhält. Sowohl die Thyminsäure als die Salmonnucleinsäure verhindert den Nachweis zugesetzter Xanthinbasen durch Metallsalze. Kossel hat nun nachgewiesen, dass die Thymusnucleinsäure sich in dieser Beziehung ebenso wie die Salmonnucleinsäure verhält,

---

<sup>1)</sup> Archiv f. Anatomie u. Physiologie. Phys. Abth. 1898—1899.

<sup>2)</sup> Archiv f. exp. Pathologie u. Pharm. Bd. 37 u. 43.

er glaubt aber nicht, dass diese Nucleinsäure ihre Xanthinbasen in salzartiger Verbindung enthält. Dies beweist er<sup>1)</sup> auf folgende Weise: Setzte Kossel zu einer Lösung von Nucleinsäure Xanthinbasen, so konnte er durch Zusatz von Baryt und Alkohol die Nucleinsäure niederschlagen, während die Basen im Alkohol gelöst blieben. Ebenso verhielten sich Mischungen von Thyminsäure und Xanthinbasen, woraus Kossel den Schluss zieht, dass «die Nucleinsäure keine derartig gebundenen Xanthinbasen enthält». Schmiedeberg hat es unterlassen, die Salmonucleinsäure und Thyminsäure ebenso zu untersuchen, und wir können deshalb nicht wissen, ob die Theorie der salzartigen Bindung der Xanthinbasen in der Salmonucleinsäure richtig ist. Da nun aber Schmiedeberg's Schüler Herlant<sup>1)</sup> die Identität der Salmonucleinsäure und Thymusnucleinsäure sehr wahrscheinlich gemacht hat, so stehen die Auffassungen Kossel's und Schmiedeberg's in Widerspruch.

Kann man nun nicht die obige Auffassung Schmiedeberg's ohne Weiteres acceptiren, so steht auch die Frage nach der Zusammensetzung der Salmonucleinsäure bis auf Weiteres offen. Wir kennen eben so wenig die Constitution dieser Nucleinsäure als der übrigen oben erwähnten.

Die Constitution der nächsten Nucleinsäure, der Inosinsäure, ist dagegen ziemlich klar. Diese Säure, von Liebig und Haiser<sup>2)</sup> gefunden und untersucht, hat eine einfache Formel  $C_{10}H_{13}N_4PO_8$  und ist aus einer Phosphorsäure, welche mit Hypoxanthin und wahrscheinlich Oxyvaleriansäure verbunden ist, zusammengesetzt. Die Inosinsäure hat also eine sehr einfache Constitution.

Die letzte Nucleinsäure ist die Guanylsäure, welche vom Verfasser<sup>3)</sup> untersucht und beschrieben worden ist. Da diese Nucleinsäure in der vorliegenden Abhandlung der Gegenstand unserer Untersuchung sein soll, dürfte es zweck-

---

1) l. c.

2) Monatsh. f. Chemie Bd. 16.

3) Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. XXV.

tuliren.

Die Guanylsäure lässt sich aus dem Pancreasproteid darstellen, man kann aber auch das Pancreas selbst hierzu benutzen. Da sie sehr fest mit dem Eiweiss verbunden ist, muss man das Proteid mit Alkalilauge kochen, um die Verbindung zu spalten. Man kann dies allerdings auch durch Kochen mit Wasser allein erzielen, die Ausbeute wird aber dann sehr schlecht.

Die Guanylsäure ist sehr leicht in heissem Wasser löslich, dagegen ist die Löslichkeit in kaltem Wasser verhältnissmässig klein. Da nun die Guanylsäure gegen die Einwirkung heissen Wassers resistent ist, so kann man sie zweckmässig durch wiederholtes Lösen in heissem Wasser von den Verunreinigungen befreien. Die Guanylsäure ist in Mineralsäuren und Alkalien löslich, dagegen ist sie in verdünnter Essigsäure schwer löslich. Auch wird sie von Essigsäure aus ihrer Lösung in Alkali niedergeschlagen.

Die Guanylsäure verbindet sich mit Metalloxyden zu Salzen, die gewöhnlich unlöslich oder schwerlöslich im Wasser sind.

Die Zusammensetzung der Säure war im Durchschnitt 34,18% C, 4,43% H, 18,21% N und 7,64% P. Diese Zusammensetzung stimmte am besten mit einer Formel  $C_{22}H_{34}N_{10}P_2O_{17}$  überein.

Von den Spaltungsprodukten wurde eine Pentose erkannt, welche in einer Menge von ca. 30% vorkommt, als Traubenzucker berechnet. Weiter enthielt die Guanylsäure mindestens 35% Guanin. Ausser Guanin wurde keine andere Xanthinbase gefunden. Als drittes Spaltungsprodukt wurde Ammoniak gefunden. Doch konnte der Verfasser nicht mit Bestimmtheit die Möglichkeit abweisen, dass das Ammoniak ein secundäres Spaltungsprodukt war. Im Gegentheil war dies nicht unwahrscheinlich. Das Thymin wurde unter den Spaltungsprodukten vermisst. Im Ganzen wurde also von den Spaltungsprodukten etwa 85% wiedergefunden, die Phosphorsäure mitgerechnet. Es blieb also ein Deficit von etwa 15%,

das aus unbekannten Substanzen bestand, abgesehen davon, dass die Spaltung wahrscheinlich eine hydrolytische ist. Da ich damals versprochen hatte, diese Spaltungsprodukte zu erforschen, so will ich jetzt mein Versprechen erfüllen.

Die Aufgaben, welche noch zur Erforschung der Guanylsäure vorliegen, sind die folgenden:

1. Durch die Analyse einiger Salze der Säure die empirische Formel festzulegen.

2. Man muss entscheiden, ob das Ammoniak ein primäres oder secundäres Spaltungsprodukt ist.

3. Es müssen die unbekannten Spaltungsprodukte erforscht werden, und wenn sämtliche Componenten der Guanylsäure gefunden sind, kann man zur Aufstellung der rationellen Formel übergehen.

Einige Fragen stehen noch aus, z. B. über die Natur der Pentose, wir werden aber diese nicht berühren. Nachdem ich mir eine neue Portion Guanylsäure dargestellt hatte, wurde erst die Zusammensetzung untersucht. Eine N-Analyse ergab 18,08% N, eine C- und H-Bestimmung 34,18% C und 4,53% H. Die Analysen stimmen somit mit den vorigen, und wir können das Guanylsäurepräparat als rein bezeichnen. Von diesem Präparate wurde das Silbersalz dargestellt durch Fällung des Guanylsäurealkali mit Silbernitrat. Der Niederschlag, welcher lichtempfindlich ist, wurde ausgewaschen, getrocknet und pulverisirt. Da das Silbersalz phosphorhaltig ist, so kann man das Silber nicht allein durch Glühen bestimmen. Ich versachte deshalb das Präparat, zog es mit kochender Salpetersäure so oft aus, als das Filtrat noch eine Silberreaction gab, und schlug das Silber mit Chlornatrium nieder. Das Chlorsilber wurde auf gewöhnliche Weise bestimmt.

1. 0,1752 g Substanz abgewogen  
0,0594 g AgCl  
0,0441 g Ag = 25,52%.
2. 0,2260 g Substanz abgewogen  
0,0772 g AgCl  
0,0581 g Ag = 25,71%.
3. 0,2385 g Substanz abgewogen  
0,0811 g AgCl  
0,0612 g Ag = 25,60%.

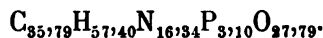
Molekularzahl des Silbersalzes wird demgemäss 431 und die der Guanylsäure 314.

Es lässt sich aber leicht zeigen, dass die Molekularzahl der Guanylsäure grösser sein muss als 314, da wir ja 7,64% P gefunden haben, was einer Zahl der P-Atome von 0,78 entspricht, wenn wir eine Molekularzahl von 314 voraussetzen. Folglich muss die Guanylsäure eine mehrbasische Säure sein. Die Molekularzahl ist deshalb ein Multiplum von 314, oder  $n \times 314$ .

Setzen wir  $n = 2$ , wird die Zahl der Atome des Phosphors 1,56;  $n = 3$  gibt  $P = 2,34$ ,  $n = 4$  fordert  $P = 3,12$  und  $n = 5$ ,  $P = 3,90$ .

Man kann hieraus den Schluss ziehen, dass  $n$  wahrscheinlich 4 oder 5 ist, da nur diese Zahlen einen passenden Werth für den Phosphor geben. Die Molekularzahl wird deswegen entweder 1236 oder 1570.

Dass die erste Molekularzahl 1236 unmöglich oder jedenfalls wenig wahrscheinlich ist, geht aus der entsprechenden Formel hervor. Diese Formel wird nämlich



Setzen wir dagegen die Molekularzahl zu 1570, so bekommen wir die Formel  $C_{44,72}H_{71,75}N_{20,42}P_{3,87}O_{35,26}$ , also auch nicht eine besonders gute Uebereinstimmung.

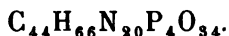
Nehmen wir aber an, dass wir etwa 0,3% zu wenig Silber wiedergefunden haben, was nicht unmöglich ist, wenn man das ungewöhnlich complicirte Verfahren zur Bestimmung des Silbers bedenkt, so werden die Molekularzahlen entweder 1236 oder 1545. Die Molekularzahl 1236 gibt dann eine Formel  $C_{35,20}H_{56,49}N_{16,08}P_{3,05}O_{27,35}$ , welche mit einer Formel  $C_{35}H_{56}N_{16}P_3O_{27}$  übereinstimmt. Die Molekularzahl 1545 dagegen gibt eine Formel  $C_{44,01}H_{70,60}N_{20,09}P_{3,81}O_{34,19}$  also abgerundet:  $C_{44}H_{70}N_{20}P_4O_{34}$ .

Wir werden jetzt untersuchen, wie diese Formel mit der procentischen Zusammensetzung harmonirt.

	$C_{36}H_{56}N_{16}P_2O_{37}$	$C_{44}H_{70}N_{20}P_4O_{34}$	
C	34,29%	34,15%	34,18%
H	4,57%	4,53%	4,57%
N	18,29%	18,11%	18,21%
P	7,59%	8,02%	7,64%

Man sieht also, dass beide Formeln ganz gut mit der procentischen Zusammensetzung harmoniren, die erste Formel vielleicht am besten. Indessen wird der Verfasser sich entschieden für die zweite Formel aussprechen. Es ist nämlich wenig wahrscheinlich, dass man zuviel Phosphor gefunden hat, dagegen hat ein theoretischer Phosphorwerth von 8,02% viel mehr für sich und stimmt ungefähr mit dem, was man durch die P-Analysen erwarten kann. Der Verfasser glaubt deswegen, dass die Formel  $C_{44}H_{70}N_{20}P_4O_{34}$  am besten stimmt sowohl mit den Elementar-Analysen als auch mit der Berechnung des Silbersalzes. Es lässt sich auch leicht zeigen, dass diese Formel keine Variation der Zahlen der Atome des C, N, P und zulässt. Nur einige Variationen des Wasserstoffes sind möglich. Die Formel  $C_{44}H_{70}N_{20}P_4O_{34}$  ist genau zweimal so gross, als die erste vom Verfasser aufgestellte Formel  $C_{22}H_{34}N_{10}P_2O_{17}$ .

Wir werden unten zeigen, dass die H-Atome nicht 70, aber wahrscheinlich 66 sind. Die endliche Formel der Guanylsäure ist deshalb:



Weiter kann man hieraus folgern, dass die Guanylsäure eine 5-basische Nucleinsäure ist. Das Silbersalz hat also die folgende Zusammensetzung:



Wenn die Formel zeigt, dass die Guanylsäure 20 Atome Stickstoff enthält, so wird die Existenz des Ammoniaks als primäres Spaltungsprodukt der Guanylsäure sehr zweifelhaft. Wäre dies der Fall, so muss man eine Formel mit mindestens 90 Atomen N annehmen. Wir werden diese Frage genauer untersuchen.

Meine erste publicirte Untersuchung über die Spaltungsprodukte der Guanylsäure haben einen vorläufigen Ammoniak-

Zahl sehr unsicher, da nur ca. 0,1 g Guanylsäure zu der Bestimmung von  $\text{NH}_3$  nach Schlösing benutzt worden war.

Ich habe diesmal erstens eine grössere Guanylsäuremenge benützt und zweitens habe ich die Methode verbessert.

Nachdem ich nämlich die Guanylsäure mit 5%iger Schwefelsäure 3 Stunden gekocht hatte, wurde die Lösung in einen Destillationskolben übergeführt und mit einem Ueberschuss von Magnesia destillirt. Selbstverständlich habe ich durch Versuche mit Guaninsulfat (aus dem Pancreasproteid dargestellt) die Methode ausprobiert und anwendbar gefunden.

0,3984 g Guanylsäure (Präp. Nr. IV) wurde mit 100 ccm. 5%iger Schwefelsäure 3 Stunden auf dem Wasserbade gekocht und danach mit 10 g  $\text{MgO}$  destillirt. 0,33 ccm. Titirschwefelsäure wurde verbraucht, was 0,00046 g N = etwa 0,11% N entspricht.

0,6684 g Guaninsulfat wurde 3 Stunden mit 100 ccm. 5%iger Schwefelsäure gekocht und danach mit 10 g  $\text{MgO}$  destillirt. Die gefundene N-Menge war 0,0008 g.

Man kann aus diesen Versuchen den Schluss ziehen, dass eine sehr kleine Ammoniakmenge aus der Guanylsäure durch Kochen mit 5%iger Schwefelsäure entsteht. Diese  $\text{NH}_3$ -Menge entspricht aber ungefähr dem, was aus Guanin durch Kochen mit 5%iger Schwefelsäure entsteht. Das Ammoniak ist deshalb kein primäres Spaltungsprodukt, entsteht dagegen wahrscheinlich aus dem gebildeten Guanin.

Wenn dies der Fall ist, kann man mit grosser Wahrscheinlichkeit auch andere stickstoffhaltige Spaltungsprodukte ausschliessen, absolut sicher ist man aber nicht.

Wenn man davon ausgeht, dass Guanin das einzige N-haltige Spaltungsprodukt ist, enthält die Guanylsäure 39,29% Guanin, während wir nur etwa 35% gefunden haben.<sup>1)</sup> Indessen wissen wir, dass ein wenig Guanin durch das Kochen mit Mineralsäure zerstört worden ist. Auch ist die Fällung

---

<sup>1)</sup> Bang, l. c.

mit ammoniakalischem Silber nicht ganz absolut. Etwas Guanin ist deshalb wahrscheinlich verloren gegangen. Es lässt sich aber einigermaßen berechnen, wieviel Guanin man nach dem Kochen mit der Mineralsäure durch die ammoniakalische Silberfällung wiederfinden kann. Ich habe zwei solche Versuche ausgeführt. Abgewogene Mengen Guanin wurden 3 Stunden mit 5%iger Schwefelsäure gekocht und danach mit Silbernitrat und Ammoniak gefällt. Der Niederschlag wurde getrocknet, gewogen und auf Guanin umgerechnet.

- |                                  |  |
|----------------------------------|--|
| 1. 0,1222 g Guanin abgewogen.    | 0,1208 g wiedergefunden = 98,16%       |
| 2. 0,1144 g                    " | 0,1114 g                    " = 97,38% |

Im Durchschnitt wiedergefunden = 97,77%

Nimmt man an, dass man auch bei den Guanylsäureversuchen etwa 97,77% wieder gefunden hat, wird das Resultat der Guaninbestimmungen 36,55% Guanin, also 2,74% weniger als der theoretische Werth, und doch haben wir nur zwei Analysen ausgeführt und mit sehr kleinen Substanzmengen. Leider habe ich diesmal nicht mehrere Guaninbestimmungen ausführen können. Es ist aber nach meiner Ansicht ziemlich gut festgestellt, dass aller Stickstoff sich als Guanin in dem Guanylsäuremolekül vorfindet. Die Guanylsäure enthält demgemäss 4 Moleküle Guanin.

Es lässt sich hieraus berechnen, wie viel Zucker die Guanylsäure enthalten muss.

$$39,3\% \text{ Guanin} : 30\% \text{ Zucker} = 4 (151) : X (150)$$

$$X = 3,07.$$

Folglich enthält die Guanylsäure 3 Moleküle Zucker als Pentose berechnet. Nun haben wir aber die Pentose immer als Traubenzucker berechnet, da die hypothetische Pentose in Beziehung auf Reduktionsvermögen uns nicht bekannt ist. Nehmen wir an, dass unsere Pentose dasselbe Reduktionsvermögen wie die Xylose hat, so haben wir nur 27% Pentose titrimetrisch bestimmt gefunden. Dies entspricht einer Zahl der Moleküle der Zuckergruppe von 2,76. Nun habe ich aber nachgewiesen, dass man niemals durch Kochen der Guanylsäure mit einer Mineralsäure die ganze Zuckermenge finden kann, da die Bildung von Zucker immer von einer fortlaufenden



halb einen theoretischen Zuckerwerth von 29% anstatt 27% supponirt, wird die Molekularzahl 2,97, also ganz genau 3 Moleküle Zucker.

Bei dieser Berechnung haben wir immer vorausgesetzt, dass unsere Zuckerart eine Pentose sei. Und in der That ist es viel wahrscheinlicher, dass wir eine Pentose mit grösserem Reduktionsvermögen vor uns haben, da wir, wie oben erwähnt, sicher zu wenig Zucker bei unseren Analysen gefunden haben und demgemäss aus diesen Analysen einen kleinen Multiplikator finden müssen als umgekehrt.

Gehen wir nun zu den bis jetzt unbekannten Spaltungsprodukten über, so werden wir die völlige Bestätigung unserer obigen Deductionen finden.

War die Formel der Guanylsäure  $C_{44}H_{66}N_{20}P_4O_{34}$ , haben wir unter den Spaltungsprodukten, abgesehen von dem Phosphor, gefunden:  $4 C_5H_5N_5O + 3C_5H_{10}O_5$ , zusammen 35 und 20 N. Als Rest bleiben also 9 C und kein N. Die letzten Spaltungsprodukte enthalten folglich 9 Atome C, sind also stickstofffrei.

Es hat sich herausgestellt, dass das letzte Spaltungsprodukt der Guanylsäure Glycerin ist.

Die Existenz des Glycerins in der Guanylsäure wurde auf folgende Weise constatirt:

Nachdem ich die oben erwähnte Guanylsäure (0,3984) mit Magnesia destillirt hatte, wurde der Rest mehrmals mit 97%igem Alkohol ausgezogen. Der Alkohol wurde langsam verdunstet. Das Residuum wurde nach König<sup>2)</sup> auf Glycerin untersucht.

Es wurde mit Quarzsand und Kalkmilch eingedampft und dann mit heissem absoluten Alkohol extrahirt. Das alkoholische Filtrat wurde nach 24 Stunden filtrirt und das neue Filtrat vorsichtig eingedampft und aufs Neue mit absolutem Alkohol extrahirt. Der Alkohol wurde mit Aether versetzt.

---

1) Bang, l. c.

2) Untersuchung landwirthsch. u. gewerbl. wichtiger Stoffe.

und nach einigen Stunden filtrirt. Der Aetheralkohol wurde verjagt und es blieb ein Syrup zurück.

Dieser Syrup hatte folgende Eigenschaften :

Er schmeckte schwach süß, reducirte aber nicht Kupferoxyd und Alkali.

Er gab die Acroleinreaction durch Erhitzen mit Kaliumbisulfat. Eine Verkohlung fand hierbei nicht statt. Die Lösung ist also zuckerfrei.

Er gab eine grüne Boraxperle.

Man kann hieraus schliessen, dass Glycerin vorlag. Die Existenz des Glycerins wurde dennoch weiter gesichert. Die Lösung wurde mit Alkali und überschüssigem Permanganat versetzt und eine halbe Stunde gekocht. Die blaue Lösung wurde dann mit  $\text{SO}_2$  entfärbt und filtrirt. Das Filtrat versetzte ich mit  $\text{CaCl}_2$  und bekam eine krystallinische Fällung. Diese Fällung wurde mit Schwefelsäure versetzt und schwach erhitzt. Eine zugesetzte verdünnte Permanganatlösung wurde sofort entfärbt. Folglich enthielt die Lösung Oxalsäure, nach Fox-Wanklyn und Benedikt-Zsigmondy<sup>1)</sup> ein charakteristisches Spaltungsprodukt des Glycerins durch Oxydation mit Permanganat.

Die Guanylsäure enthält also Glycerin und die Existenz des Glycerins wurde weiter durch die Acroleinreaction in mehreren Guanylsäurepräparaten gesichert. Zwar ist der Zucker der Guanylsäure bei der Acroleinreaction lästig, man kann aber sehr deutlich nach der Zerstörung des Zuckers durch Kaliumbisulfat das Acrolein erkennen.

Man kann nun den Einwand machen, dass die Guanylsäure vielleicht durch Fett oder Lecithin verunreinigt war. Hierzu ist zu bemerken, dass ich die Guanylsäurepräparate mit Alkohol und Aether extrahirte, bis diese Lösungsmittel nichts mehr aufnahmen. Der Einwand ist folglich hinfällig.

Nachdem wir die Existenz des Glycerins erkannt haben, bleibt noch zu untersuchen, ob das Glycerin das letzte Spaltungsprodukt der Guanylsäure ist, oder ob diese Nucleinsäure

---

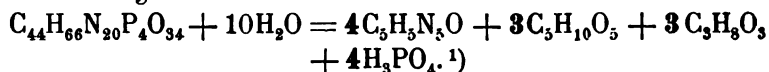
<sup>1)</sup> Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. 25.

der Glycerinmenge einen Parallelversuch mit 0,05 g Glycerin in 100 ccm. Wasser ausgeführt. Diese Lösung wurde ganz wie die der Guanylsäure behandelt. Durch Titrierung der gebildeten Oxalsäure konnte man ungefähr bestimmen, dass die Lösung der Guanylsäure nicht weniger Glycerin als 0,05 g Glycerin enthielt. Die Guanylsäure enthält demgemäss mindestens ca. 12% Glycerin.

Man kann daraus sicher den Schluss ziehen, dass das Glycerin das letzte Spaltungsprodukt der Guanylsäure ist.

Die Zusammensetzung der Guanylsäure ist hiermit erforscht, und wir können jetzt die Constitution feststellen.

Die Guanylsäure enthält: 4 Moleküle Guanin, 3 Moleküle Zucker, 3 Moleküle Glycerin und 4 Moleküle Phosphorsäure. Nehmen wir an, dass die Spaltung der Guanylsäure durch Kochen mit einer Mineralsäure eine hydrolytische ist, so muss sie auf folgende Weise verlaufen:

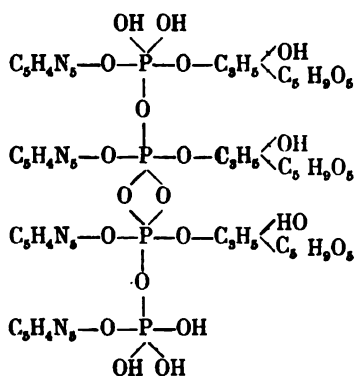


Da wir nun 4 Moleküle Phosphorsäure und 4 Moleküle Guanin haben, so können wir annehmen, dass wir 4 mit einander verbundene Phosphorsäuren besitzen, jede mit einem Molekül Guanin verbunden. Die 3 Moleküle Glycerin sind wahrscheinlich sowohl mit den Phosphorsäuren als Glycerinphosphorsäure als auch mit den 3 Molekülen Zucker verkettet. 3 Moleküle Phosphorsäure sind also sowohl mit Guanin als Glycerin verbunden. 1 Molekül Phosphorsäure ist nur mit Guanin verbunden. Endlich erinnern wir uns, dass die Guanylsäure eine 5-basische Säure ist.

Auf diese Voraussetzungen bauend, denke ich mir die Constitution der Guanylsäure folgendermassen:

---

1) Selbstverständlich kann hier eine Anhydridform der Phosphorsäure ebenso gut vorkommen. Nur braucht man dann weniger  $\text{H}_2\text{O}$  zur Hydrolyse.



Die Erkenntniss der Constitution der Guanylsäure bietet in mehreren Beziehungen Interesse dar. Abgesehen von der Thatsache, dass hierdurch zum ersten Mal eine Nucleinsäure vollständig untersucht und beschrieben worden ist (die Inosinsäure ist nicht so vollständig untersucht), haben wir bewiesen: 1. Die Guanylsäure enthält nur eine Xanthinbase. Aller Stickstoff wird von dem Guanin geliefert. 2. Die Guanylsäure enthält eine Pentosegruppe. Salkowski's Untersuchung des Osazons hat hierdurch eine Bestätigung bekommen. Niemand kann jetzt an der Existenz der Pentose im Pancreasproteid und in der Guanylsäure zweifeln. 3. Die Guanylsäure enthält Glycerin, das als Glycerinphosphorsäure vorkommt. Die Guanylsäure bekommt hierdurch ein besonderes Interesse. Sie stimmt nämlich mit dem Lecithin sehr überein. Beide haben als Kern Glycerinphosphorsäure, welche im Lecithin mit Fettsäure und Cholin verbunden ist, in der Guanylsäure aber mit Zucker und Guanin. Es ist auch nicht unwahrscheinlich, dass diese Substanzen auch mit einander verwandt sind. Licithin wird ja allgemein als Baumaterial der Nucleoproteide bzw. Nucleinsäuren angesehen. Während sonst die Lecithine bis zum Phosphor gespalten werden, bleibt hier die ganze Glycerinphosphorsäure zum Aufbau der Guanylsäure angewandt. Es ist selbstverständlich, dass man nach dem Vorkommen von Glycerin in der Guanylsäure auch anderswo besonders unter den Nucleinsäuren und Nucleoproteiden nach Glycerin suchen muss. Man kann ja möglicher

weise auch Substanzen begegnen, welche noch näher mit Lecithin übereinstimmen. Die Lecithalbumine, Ovovitelline etc. können vielleicht Glieder derselben Gruppe wie die Nucleoproteide sein. Als Zwischenglieder haben wir dann Substanzen, welche dem Lecithalbumine näher oder ferner stehen. Jedenfalls dürfte die Zusammensetzung der Guanylsäure zu einer wiederholten Untersuchung der Lecithalbumine und verwandter Substanzen anregen.

In Vergleich mit den übrigen Nucleinsäuren nimmt die Guanylsäure eine Sonderstellung ein. Es ist nicht mit Kossel richtig, dieselbe in einer gemeinsamen Gruppe mit der Inosinsäure zusammenstellen, da diese Nucleinsäuren nicht mit einander näher verwandt sind. Keine anderen Nucleinsäuren haben solche physikalischen und chemischen Eigenschaften, keine haben eine ähnliche Zusammensetzung. Auch ist die empirische Formel ziemlich verschieden.

Stellen wir die Nucleinsäuren nach ihrer Formel zusammen, so bekommen wir folgende Tabelle:

	C	H	N	P	O
Inosinsäure . . .	10	13	4	1	8
Salmonucleinsäure	40	56	14	4	26
Hefenucleinsäure <sup>1)</sup>	40	60	16	4	32
Guanylsäure . .	44	66	20	4	34

(Die ersten von Kossel veröffentlichten Formeln über Hefenucleinsäure und Thymusnucleinsäure sind wahrscheinlich unrichtig; sie werden deshalb nicht mitgenommen).

Man sieht, dass die Zahlen ziemlich weit von einander differiren. Constant ist allein der Phosphor (abgesehen von der Inosinsäure). Alle drei Nucleinsäuren bestehen aus 4 Molekülen Phosphorsäure. Dagegen ist das Verhältniss N : P sehr wechselnd, ein Verhältniss von 3 N : 1 P, wie Kossel es als das Gewöhnliche annimmt, kommt überhaupt nicht vor. Eine Uebersichtstabelle wird dies erleuchten:

---

<sup>1)</sup> Analyse von Miescher. Nach Schmiedeberg waren aber die Präparate nicht ganz rein.

	C	H	N	P
Inosinsäure . . . . .	10	: 13	: 4	: 1
Hefenucleinsäure . . . . .	10	: 15	: 4	: 1
Salmonucleinsäure . . . . .	10	: 14	: 3,5	: 1
Guanylsäure . . . . .	11	: 16,5	: 5	: 1

Man sieht, wie sehr das Verhältniss der Zahlen variirt. Am meisten constant ist das Verhältniss zwischen P und C, nämlich 10 C : 1 P; nur bei der Guanylsäure ist das Verhältniss 11 C : 1 P.

Die Erforschung der Guanylsäure in chemischer Beziehung ist zu Ende geführt. Wie man das Nucleoproteid Hammarsten's aus Pancreas als das beststudirte Nucleoproteid ansehen muss, so hoffe ich durch meine Untersuchung der Guanylsäure, des Spaltungsproduktes dieses Nucleoproteids, die klassische Arbeit Hammarsten's in einer Beziehung zum Abschluss geführt zu haben.



## **Zur Abwehr.**

Von

**A. Kossel.**

---

Der vorhergehenden Arbeit hat Herr Bang eine Litteraturübersicht vorausgeschickt, welche dazu bestimmt ist, den Werth meiner Arbeiten über die Nucleinsäure herabzusetzen. Herr Bang, der bei seinen Untersuchungen über die Nucleinsäure, ebenso wie bei denen über das Histon, im Wesentlichen auf dem Boden steht, der durch meine früheren Arbeiten gewonnen ist, hält sich für berufen, zu untersuchen, ob meine Resultate nicht prompter und sicherer hätten erzielt werden können, und kommt zu einem absprechenden Urtheil über meine Arbeitsweise.

Der Umstand, dass die Darstellungsweise des Herrn Bang offenbar einen tendenziösen und persönlichen Charakter trägt, überhebt mich meines Erachtens der Nothwendigkeit einer Entgegnung nicht. Zunächst halte ich es für nöthig, ausdrücklich hervorzuheben, dass die Lehre von der Zusammensetzung der Nucleinsäuren aus den Nucleinbasen, dem Thymin und der Lävulinsäure bildenden Gruppe, ferner die Trennung der Nucleinstoffe von den Paranucleinstoffen und endlich die Eintheilung der Nucleinstoffe in mehrere Gruppen heute so dasteht, wie sie durch meine, zum Theil mit meinen Schülern gemeinsam ausgeführten Arbeiten festgestellt worden ist. Eine Aenderung meiner Resultate ist im Laufe der Jahre nur in dem Grade erfolgt, dass sie für die Gesamtauffassung nicht wesentlich war, und sie ist bedingt gewesen durch die nach einiger Zeit selbstverständlich eintretende Vervollkommenng der Darstellungs- und Untersuchungsmethoden. Die von mir

gegebene Eintheilung der Nucleinstoffe ist ebenso selbstverständlich ein Ausdruck für den jeweiligen Stand unserer Kenntnisse, mit der Entdeckung neuer Körper und mit der Aufklärung der Constitution wird sie sich allmählich ändern müssen. Bis jetzt ist aber noch kein Grund vorhanden, dies zu thun. Besonders ist die von mir aufgestellte Gruppe der Guanylsäure und Inosinsäure, die mehrere gemeinsame Eigenthümlichkeiten gegenüber den Thymonucleinsäuren darbietet, aber zwei unter sich verschiedene Glieder enthält, auf Grund der heutigen Kenntnisse in keiner Weise anzufechten.

Die Darstellung des Herrn Bang erhält dadurch ihr besonderes Gepräge, dass dieser Autor versucht, fast aus jedem meiner Befunde irgend einen Vorwurf oder eine Verdächtigung gegen mich zu entwickeln. Ich führe einige Beispiele an, um zu zeigen, welcher Grad von Urtheilsfähigkeit den Anklagen des Herrn Bang zu Grunde liegt.

Mein Kritiker fühlt sich veranlasst, tadelnde Bemerkungen darüber zu machen, dass die Zusammensetzung der Thymusnucleinsäure nicht gleich in richtiger Weise gefunden sei. Nach unsern ersten Angaben sollte dieselbe nur Adenin liefern, während wir später daneben auch noch Guanin nachweisen konnten. Herr Bang ist erstaunt darüber, dass ich das Guanin «merkwürdiger Weise» bei meinen ersten Untersuchungen nicht gefunden habe. Hätte Herr Bang die Litteratur der vorhergehenden Jahre studirt, so würde er wissen, dass die Unterscheidung von Guanin und Adenin überhaupt erst von mir herrührt und dass alle Forscher, die vor mir über diese Körpergruppe gearbeitet haben, das Adenin entweder mit Guanin oder mit Hypoxanthin verwechselt haben. Da Herr Bang sich heute im Besitz der von mir und meinen Schülern erarbeiteten Methoden befindet, so findet er den Nachweis von Guanin neben Adenin leicht und hält es für angemessen, über meine früheren Arbeiten, bei denen mir diese Methoden noch nicht in der heutigen Vollkommenheit zu Gebote standen, einige verletzendende Bemerkungen zu machen.

Im Uebrigen ist aber Herr Bang auf der Suche nach meinen Fehlern sehr beträchtlichen Irrthümern anheimgefallen.



Thatsachen lassen ist seine Angabe über die Frage der Metaphosphorsäurebildung. Nach Herrn Bang's Behauptung soll ich mich in Bezug auf diesen Punkt erheblich getäuscht haben, denn ich habe früher bewiesen, dass die aus Plasminsäure hervorgehende Metaphosphorsäure keine «gewöhnliche Metaphosphorsäure» sei, während sie später von Ascoli in meinem Laboratorium doch als eine «gewöhnliche Metaphosphorsäure» erkannt sei. In der That verhält es sich anders. Ich habe früher hervorgehoben, dass hier eine Anhydridform der Phosphorsäure vorliegt, und zugleich bemerkt, dass dieselbe keine Monometaphosphorsäure sein kann,<sup>1)</sup> während später Herr Ascoli gezeigt hat, dass sie die Eigenschaften einer Hexametaphosphorsäure besitzt.<sup>2)</sup> Herrn Bang's Ausspruch: «Kossel's Beweise haben also einer Kritik nicht Stand halten können» ist nur so zu erklären, dass der Unterschied zwischen beiden Metaphosphorsäuren dem Herrn Bang nicht bekannt ist. Herr Bang würde besser thun, sich in einem kurzgefassten Lehrbuch der Chemie über das Gebiet zu orientiren, auf dem er das Amt eines Kritikers anzunehmen gedenkt.

Es dürfte kein allgemeineres Interesse haben, auf die Darstellungsweise des Herrn Bang genauer einzugehen, nur die Frage nach dem Verhalten des Kohlehydratcomplexes zur Nucleinsäure, die in letzter Zeit vielfach die Aufmerksamkeit auf sich gelenkt hat, möchte ich kurz berühren. Ich habe zuerst angegeben, dass die Hefenucleinsäure einen reducirenden Atomcomplex abspaltet, und habe hieraus den Schluss gezogen, dass die Nucleinsäure der Hefe von der Thymusnucleinsäure und Salmonnucleinsäure verschieden ist.<sup>3)</sup> Durch diesen Befund, der neuerdings von Herlant<sup>4)</sup> bestätigt worden ist, wurde zum ersten Mal die Entstehung eines Kohlehydrats aus einem Nucleinstoff erwiesen. Die weitere sich hier anschliessende Frage, in welchem Verhältniss diese reducirende Kohlehydratgruppe zur Nucleinsäure steht, ins-

---

1) Du Bois-Reymond's Archiv für Physiologie, 1893, S. 161.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, 1899, S. 426.

3) Du Bois-Reymond's Archiv f. Physiologie, 1893, S. 159-160.

4) Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol., Bd. 44, S. 157.

besonders ob sie einem für sich existenzfähigen Nucleinsäuremolekül in ähnlicher Weise angefügt ist, wie das Eiweiss, ist auch heute noch nicht gelöst und die Arbeit von Herlant hat in diesem Punkte nichts Neues zu meinen Resultaten hinzugefügt. Vollkommen verschieden von diesem reducirenden Kohlehydrat ist die nicht reducirende, Lävulinsäure bildende Gruppe, die man — wie die Arbeiten meines Laboratoriums gezeigt haben<sup>1)</sup> — aus der Thymusnucleinsäure, Thyminsäure und der Nucleinsäure des Fischspermas abspalten kann.

Herr Bang fühlt sich auch gegenüber diesen Befunden zum Kritiker berufen. Besonders hält er den Nachweis der Kohlehydrate für ungenügend und verlangt, dass die von mir gefundene Pentose im krystallisirtem Zustand dargestellt und beschrieben werde; eine Forderung, die um so naiver klingt, da er selbst, ohne sie zu erfüllen, den Nachweis einer Pentose in der Guanylsäure geführt hat.

Weiterhin lesen wir Folgendes: «Leider hat Kossel nichts mehr über diese Pentose mitgetheilt, eine Schmelzpunktsbestimmung des Osazons ausgenommen.» Herr Bang wird wohl überrascht sein, wenn er die von ihm angeführte Stelle<sup>2)</sup> meiner Arbeit noch einmal durchliest. Der von ihm vermisste genauere Nachweis einer Pentose ist in ausführlicher Weise durch Wägung des aus Nucleinsäure dargestellten Furfuramids geführt und von mir beschrieben. Von der ganzen Anklage bleibt also auch hier nichts übrig, als das Zeugniß, welches Herr Bang sich selbst damit ausgestellt hat.

Durch diese Beispiele dürfte das Verfahren des Herrn Bang genügend charakterisirt sein.

---

<sup>1)</sup> Kossel und Neumann, Berichte d. deutschen chem. Ges. 1894, Bd. 27, S. 2215. A. Noll, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 430.

<sup>2)</sup> Du Bois Reymond's Archiv f. Physiologie, 1893, S. 159-160.

# Ueber die Steigerung des Eiweisszerfalls durch Protoplasma- gifte, speciell Chloroformwasser, beim Pflanzenfresser.

Von

**Dr. Otto Rostoski,**

I. Assistenten der med. Klinik zu Würzburg.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 23. November 1900.)

---

Zu den mannigfachen schädlichen Wirkungen, welche die Chloroformnarkose nachgewiesenermassen auf den thierischen Organismus ausübt, gehört auch eine beträchtliche Steigerung der Stickstoffausscheidung durch den Harn. Insbesondere hat Fr. Strassmann<sup>1)</sup> beim Hunde im Stickstoffgleichgewicht nachweisen können, dass die N-Ausscheidung durch eine mehrstündige Chloroformnarkose um  $\frac{1}{5}$  steigt, und dass sich diese Wirkung auf 2 Tage erstreckt. Ein schon 2 Jahre vorher von Salkowski<sup>2)</sup> zu anderen Zwecken an einem ebenfalls im Stickstoffgleichgewicht befindlichen Hunde angestellter Versuch bewies jedoch, dass die vermehrte Stickstoffausscheidung mit der Narkose nichts zu thun habe, sondern lediglich dem Chloroform als einem Protoplasmagifte zukomme. Indem nämlich Salkowski einem Hund 4 Tage lang 200,0 ccm. Chloroformwasser gab, erreichte er am letzten Tage eine N-Ausfuhr von 25,29 gr (gegen 17,0 gr vor der Chloroformwirkung), während jede narkotische Wirkung ausblieb.

Ein zweiter Punkt, auf den sich die Aufmerksamkeit der Autoren richtete, ist die Schwefelausscheidung unter Chloroform-

---

1) Die tödtliche Nachwirkung des Chloroforms. Virchow's Archiv, Bd. 115 (1889), S. 1.

2) Zur Kenntniss der Wirkungen des Chloroforms. Virchow's Archiv, Bd. 115 (1889), Seite 339.

wirkung, die natürlicher Weise, da der Schwefelgehalt des Harns — beim Carnivoren und Amphivoren wenigstens — seinen Ursprung dem Schwefel des Eiweissmoleküls verdankt, mit dem vermehrten Eiweisszerfall steigen musste. Bezüglich dieser Frage machten jedoch Kast und Mester<sup>1)</sup> auch auf die interessante Thatsache aufmerksam, dass nach längeren Chloroformnarkosen ( $1\frac{1}{2}$  Stunden und darüber) der mit dem Harn ausgeschiedene neutrale Schwefel eine bedeutende Zunahme im Verhältniss zum oxydirten sogenannten sauren Schwefel aufweist. Während vor der Narkose in 4 Fällen der neutrale Schwefel 12,5%, 16,6%, 14,9% und 10,4% von der Gesamtschwefelmenge betrug, lauteten die entsprechenden Zahlen nach der Narkose 20,8%, 30,8%, 23,2% und 20%. Rudenko<sup>2)</sup> fand im Laboratorium von E. Salkowski, dass beim Hunde, der 4 Tage lang 200,0 ccm. Chloroformwasser bekommen hatte, der neutrale Schwefel von 17,35% auf 28,02% stieg, während das Verhalten des Gesamtschwefels zum Stickstoff constant blieb. Zugleich ergab sich die interessante Thatsache, die auch Savelieff<sup>3)</sup> bestätigen konnte, dass der neutrale Schwefel erst nach einigen Tagen aus dem Organismus ausgeschieden wird. Dasselbe Verhalten constatirte Presch<sup>4)</sup> beim Menschen, der zu anderen Zwecken  $1 \times 0,5$  bis  $2 \times 1,5$  Schwefel pro die erhielt. Der vierte Theil des einverleibten Schwefels wurde bei dem Versuch von Presch in organische Substanz übergeführt und langsamer ausgeschieden als der übrige zu Säure oxydirte Schwefel. Die Beobachtung, dass bei erhöhter Stickstoffausfuhr der neutrale Schwefel im Verhältniss zum sauren steigt, dürfte um so mehr Beachtung

---

1) Ueber Stoffwechselstörungen nach länger dauernder Chloroformnarkose. Zeitschr. f. klin. Medicin, Bd. 18 (1891).

2) Ueber das Verhalten des neutralen Schwefels bei Stoffwechselstörungen und über die Oxydation desselben im thierischen Organismus. Virchow's Archiv, Bd. 125 (1891).

3) Ueber den Einfluss des Eiweisszerfalls auf die Ausscheidung des neutralen Schwefels. Virchow's Archiv, Bd. 136 (1894).

4) Ueber das Verhalten des Schwefels im Organismus und den Nachweis der unterschwefligen Säure im Menschenharn. Virchow's Archiv, Bd. 119 (1890).

bei gesteigerter Schwefelausscheidung in Folge veränderter Ernährung der absolute Werth des neutralen Schwefels annähernd constant bleibt, während nur der Werth für den sauren Schwefel entsprechend steigt. Auf Procent berechnet nimmt also in letzterem Falle der neutrale Schwefel bei gesteigerter Gesamtschwefel- und Stickstoffausfuhr ab, während er gerade umgekehrt, wenn Körpereiwiss zur Einschmelzung kommt, mit der vermehrten Stickstoff- und Gesamtschwefelausfuhr zunimmt. Die beim Menschen gemachten Beobachtungen Freund's stehen allerdings im Widerspruch zu Kunkel's<sup>2)</sup> Versuch, der beim Hunde nachwies, dass durch eine gesteigerte Fleischration der neutrale und der saure Schwefel in gleicher Weise zunehmen.

Ausser dem Chloroform ist von verschiedenen Autoren der Einfluss anderer dem Chloroform mehr oder minder nahe stehender Mittel auf die Stickstoff- und Schwefelausscheidung untersucht worden. Es sind besonders die Arbeiten von Ken Taniguti,<sup>3)</sup> Martin Hahn,<sup>4)</sup> Julius Peiser,<sup>5)</sup> Harnack und Remertz,<sup>6)</sup> Harnack und Kleine<sup>7)</sup> zu erwähnen.

Aus diesen Arbeiten geht im Allgemeinen hervor, dass sich Chloralhydrat wie Chloroform verhält. Eine Herabsetzung der Stickstoffausfuhr bewirkt nach den Versuchen von Harnack und Remertz sowie Peiser das Amylenhydrat. Ver-

---

1) Zur Kenntniss der Schwefelausscheidung bei Säuglingen. Zeitschr. f. physiologische Chemie, Bd. XXIX (1900), S. 24.

2) Ueber den Stoffwechsel im Säugethierkörper. Pflüger's Archiv, Bd. 14.

3) Ueber den Einfluss einiger Narkotika auf den Eiweisszerfall. Virchow's Archiv, Bd. 120 (1890).

4) Ueber den Einfluss des Sulfonals auf den Eiweisszerfall. Virchow's Archiv, Bd. 125 (1891).

5) Ueber den Einfluss des Amylenhydrats und Chloralhydrats auf die Stickstoffausscheidung beim Menschen. Fortschritte der Medicin 11.

6) Ueber die Beeinflussung der Stickstoff- und Schwefelausscheidung durch Chloralhydrat und Amylenhydrat. Fortschritte der Medicin 11 Nr. 7.

7) Ueber den Werth genauer Schwefelbestimmungen im Harn für die Beurtheilung von Veränderungen des Stoffwechsels. Zeitschrift für Biologie. N. F., Bd. 19, S. 417.

änderungen in der Schwefelausscheidung sind bei diesem Mittel von Harnack und Remertz constatirt, von Harnack und Kleine jedoch in nennenswerthem Maasse vermisst worden. Auch Sulfonal ist nicht wirksam (Hahn). Harnack vermuthet deshalb, dass die Wirkung auf abgeschiedenem Chlor beruht, das als urochloralsaures Natron erst spät ausgeschieden wird, und hat seine Ansicht dadurch zu stützen gesucht, dass er einem Thiere Chloralhydrat und Soda zugleich gab,<sup>1)</sup> wodurch die Wirkung des Chlorals aufgehoben wurde. Harnack meint, dass die beste Erklärung hierfür darin bestehe, dass abgespaltenes Chlor bei gehöriger Alkalescenzen des Körpers gebunden wird. Das Alkali allein bewirkt nach den Versuchen desselben Autors eine Zunahme des sauren Schwefels, während Salkowski, Jawein<sup>2)</sup> und Ken Taniguti,<sup>3)</sup> die allerdings — ebenfalls bei einem Versuch am Hunde — grössere Dosen gaben (Jawein bis zu 20,0 Natr. bicarb., Ken Taniguti bis zu 16,0 essigs. Natr.), zu dem Resultat kamen, dass eingeführte Alkalien die Oxydationsvorgänge im menschlichen Körper auch mit Bezug auf die Schwefelausscheidung steigern.

Die bisher angeführten Versuche beziehen sich, soweit sie nicht den Menschen<sup>4)</sup> selbst betreffen, sämmtlich auf Hunde, also auf Fleischfresser. Beim Hunde sind auch Harnack und Remertz<sup>5)</sup> zu dem überraschendem Resultat gekommen, dass die vermehrte Stickstoffausscheidung in Folge Einführung von Chloralhydrat nicht durch eine entsprechende Steigerung

---

1) Zeitschrift für Biologie, N. F., Bd. 19, S. 453.

2) Zeitschrift f. klinische Medicin, Bd. 22.

3) Virchow's Archiv, Bd. 117 (1889).

4) Angaben über die Schwefelausscheidung beim Menschen finden sich schon in Leube und Salkowski «Die Lehre vom Harn», Berlin 1882, S. 174 ff. Und die seitdem gemachten Angaben sind alle in der oben citirten Arbeit von Freund zusammengestellt. Um so auffallender ist es, dass Schrader in seiner Arbeit «Einige abgrenzende Ergebnisse physiologisch-chemischer Untersuchungen über den Stoffwechsel während der Schwangerschaft und im Wochenbett», Archiv f. Gynäkologie, Bd. 60, S. 534 behauptet, es hätten vor der Arbeit von Harnack und Kleine keine Angaben über die Schwefelausscheidung beim Menschen vorgelegen.

5) l. c.

mehrte Stickstoff in anderen organischen Verbindungen, wahrscheinlich mit dem Schwefel zusammen, ausgeschieden werde. Durch dieses Resultat wäre die mangelhafte Oxydation des Schwefels beim Einschmelzen von Körpereiwiss zwar nicht erklärt, aber doch mit einer andern Erscheinung, die unter den genannten Verhältnissen auftritt, gut in Einklang zu bringen.

Auf Veranlassung des Herrn Professors E. Salkowski habe ich, um das Resultat Harnack's nachzuprüfen, die Harnstoffausscheidung unter der Einwirkung eines Protoplasmagiftes einer Prüfung unterzogen und als Versuchsthiere die bisher in dieser Frage noch nicht benutzten Kaninchen gebraucht, um zugleich einen Aufschluss darüber zu bekommen, wie das Protoplasmagift beim Pflanzenfresser wirkt. Wie seiner Zeit schon Salkowski und Auerbach,<sup>1)</sup> sowie Munk<sup>2)</sup> nachgewiesen haben, verläuft ja der Stoffwechsel beim Fleischfresser und Pflanzenfresser nicht genau gleich und weist speciell Abweichungen bei der Störung der Oxydationsprocesse auf.

Ein Vorversuch am Hunde bewies mir nochmal die prompte Wirkung des von mir in Anwendung gezogenen Chloroformwassers. Die weitere Fortführung und Verwendung des Versuches wurde leider durch Eintritt eines Blasenkatarrhs unmöglich gemacht.

Brauner weiblicher Hund von 32,3 kg Gewicht. Durch 500 Pferdefleisch (= 18,1 N, mehrere Male bestimmt) und 70 Speck auf gleichmässige N-Ausfuhr durch den Harn gebracht. Die einzelnen Perioden werden durch Catheterisation abgegrenzt. Die tägliche Futterration erhält das Thier Morgens direkt nach dem Catheterisiren: sie wird sofort vollständig gefressen. Das Chloroformwasser wurde mit dem Futter gemischt. Wie die Tabelle zeigt, ist ein anfängliches Sinken der Stickstoffausfuhr, wie es Harnack und Remertz beim Hunde nach Chloralhydrat beobachteten, nicht zu constatiren.

---

<sup>1)</sup> Virchow's Archiv, Bd. 77 (1879), S. 226.

<sup>2)</sup> Archiv f. Physiologie, 1881.

Im Gegentheil stieg die Stickstoffausfuhr, sobald am 10. Tage das Protoplasmagift gegeben wurde.

Tage	Menge und spec. Gewicht	Gewicht des Thieres	N-Ausscheid. im Harn	Bemerkungen
1.	600/1030	32,3	12,8	500 Fleisch + 70 Speck
2.	400/1040	—	13,44	500 „ „ 70 „
3.	540/1037	—	15,12	500 „ „ 70 „
4.	530/1037	31,7	15,71	500 „ „ 70 „
5.	450/1042	—	16,07	500 „ „ 70 „
6.	500/1041	31,65	15,17	500 „ „ 70 „
7.	425/1043	—	16,83	500 „ „ 70 „
8.	650/1030	—	15,90	500 „ „ 70 „
9.	550/1040	—	16,13	500 „ „ 70 „
10.	660/1034	31,61	19,57	200 Chloroformw. m. d. Futter
11.	800/1032	—	21,07	200 „ „ „ „
12.	800/1031	31,15	22,01	200 „ „ „ „

Was die Versuche am Kaninchen anlangt, so wurde versucht, die Thiere durch ein aus Rüben, Kohl und rohen Kartoffeln zu gleichen Theilen gemischtes Futter auf gleichmässige Stickstoffausscheidung zu bringen. Das Chloroformwasser erhielten die Thiere Abends, wenn das Futter aufgefressen war, durch die Schlundsonde. Der Urin wurde 3 Tage lang gesammelt und sodann die Periode durch Ausdrücken der Blase abgegrenzt, wobei sich nie Schwierigkeiten ergaben. Auf eine Bestimmung des eingeführten Stickstoffs sowie des Kothstickstoffs glaubte ich auch nach der Ansicht des Herrn Professor Salkowski verzichten zu können, weil die schlackenreiche Nahrung in dem langen Darm des Kaninchens verschieden lange zurückgehalten und ausgenutzt wird. Aus demselben Grunde sind auch für die Bestimmung 3tägige Perioden gewählt worden. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen sind die aus diesen Perioden für den einzelnen Tag berechneten Werthe.

Wenn sich nicht alle Urinbestimmungen innerhalb der zur Verfügung stehenden 3 Tage ausführen liessen, wurde der Harn durch Schütteln mit Chloroform conservirt. Die Be-



bekannten Methoden; für die Bestimmung des Harnstoffs wurde die Mörner'sche Methode gewählt, jedoch mit der von Sal-kowski vorgeschlagenen Modification, dass das Ammoniak aus dem den Harnstoff enthaltenden Filtrat nicht durch Magnes. ust. vertrieben, sondern für sich im Harn nach Schlösing bestimmt und dann von dem für den Harnstoff gefundenen Werth abgezogen wurde. Hippursäure, die nach den Versuchen von Salaskin und Zaleski<sup>1)</sup> bei Anwendung der Mörner'schen Methode auf den Harn von Pflanzenfressern Fehler verursachen kann, fand sich bei mehrmaliger Untersuchung in dem Aetheralkoholauszug nicht, sodass die Methode auch nach dieser Richtung hin für unsere Versuche einwandfrei war.

### I. Versuch.

Graues weibliches Kaninchen von 2490 g Gewicht.

Datum	Harn, Menge und spezifisches Gewicht	Gewicht des Thieres	Ges. Stickstoff- aussch. täglich	Stickstoff als Harnstoff, tägl.	Procent Harnstoff	Stickstoff als Ammoniak ausgeschieden	Bemerkungen
18.-20. I.	310/1023	2940	0,91	0,812	89,74	0	195 165 } gem. Futter 155 }
21.-23. I.	150/1030	—	0,455	0,368	80,96	0	150 gem. Futter tägl.
24.-26. I.	430/1016	2770	0,601	0,531	85,38	0	tgl. 150 gem. Futter + 25,0 Wasser
27.-29. I.	390/1015	2650	0,633	0,548	86,20	0,0015	> 150 > > 25,0 >
30. 1.-1. II.	400/1014	—	0,671	0,596	88,85	0,0046	> 150 > > 25,0 >
2.-4. II.	450/1012	2540	0,628	0,593	94,33	0,0023	> 150 > > 25,0 >
5.-7. II.	400/1011	2500	0,491	0,415	84,52	0,0051	> 25,0 Chloroformw. + 150 gem. Fut.
8.-10. II.	—	2500	—	—	—	—	—

Der Versuch erreichte leider ein jähes Ende, weil das Kaninchen, nachdem 3 Tage lang 25,0 Chloroformwasser

1) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XXVIII, S. 73.

gegeben waren, am 4. Tage aus Versehen statt des Chloroformwassers von der zur Harnstoffbestimmung nöthigen Aetheralkoholmischung in den Magen bekam. Die 25 ccm. Wasser pro die vom 29. ab erhielt das Thier, um den Einfluss des Wassers auf die Erhöhung der Stickstoffausfuhr auszuschalten.<sup>1)</sup> Wenn ich trotz des nicht abgeschlossenen Versuches die Zahlen hier mittheile, so geschieht es, um darauf aufmerksam zu machen, dass sich auch beim Kaninchen eine ziemlich gleichmässige Stickstoffausscheidung durch den Harn erreichen lässt. Ferner sind die geringen Ammoniakwerthe, die mit den Angaben Salkowski's hierüber in Einklang stehen, zu beachten. Und endlich ist dieser Versuch vor den übrigen ausgezeichnet durch ein (anfängliches?) Sinken der Stickstoffausfuhr nach der Einverleibung des Chloroformwassers (wie im Versuche von Harnack und Remertz beim Hund nach Chloralhydrat). Man könnte auch daran denken, dass die verabfolgten 25 ccm. H<sub>2</sub>O infolge einer Ausspülung der Gewebe Anfangs eine verhältnissmässig hohe Stickstoffausfuhr nach sich zogen, der dann natürlich bei weiteren Wassergaben eine Verminderung der Stickstoffausfuhr folgen musste. (0,491 pro die vom 5. bis 7.) Doch halte ich diese Erklärung nicht für richtig, weil der Zeitraum bis zu der geringeren Stickstoffausfuhr zu gross wäre.

In dem Versuch beim Menschen von R. O. Neumann dauerte die durch eine grössere Wassermenge (bis zu 3—4 Liter pro die) bewirkte Steigerung der Stickstoffausfuhr immer nur 2 Tage und sank am 3. Tage schon wieder ab. In unserm Falle kämen aber 12 Tage in Betracht.

II. und III. Versuch. Zunächst ist zu erwähnen, dass es nach 3 × 3 Tagen beim II. Kaninchen gelang, eine annähernd gleiche Stickstoffausscheidung durch den Harn zu erzielen, so dass sich der Einfluss des Chloroformwassers bemerkbar machen konnte, beim Kaninchen III waren die Zahlen für den Harnstickstoff von vornherein ziemlich constant. Die

---

<sup>1)</sup> R. O. Neumann, Der Einfluss grösserer Wassermengen auf die Stickstoffausscheidung beim Menschen. Arch. f. Hygiene, 1899, S. 248.

II. Graues Kaninchen. Gewicht: 2290 g.

Datum	Gewicht des Thieres	Harn, Menge und spezifisches Gewicht	Gesamt- N-Ausfuhr täglich	N in Form von Harnstoff ausge- schieden täglich	Procent Harnstoff im Vergleich zum Gesamt-N	N in Form von Am- moniak ausge- schieden täglich	Gesamt- S-Aus- scheidung täglich als $H_2SO_4$	S in Form von Schwefelsäure aus- geschieden täglich berechnet	Bemerkungen
9.-11. II.	2290 g	600/1012	0,677	—	—	—	—	—	300 gem. Futter täglich
12.-14. II.	—	620/1013	0,511	—	—	—	—	—	300 „ „ „
15.-17. II.	2230 g	720/1011	0,700	—	—	—	—	—	300 „ „ „
18.-20. II.	2290 g	670/1010	0,499	0,420	84,24 %	0,0154	—	—	300 „ „ „
21.-23. II.	2240 g	760/1009	0,470	0,368	78,35 %	0,0056	—	—	300 „ „ „
24.-26. II.	2270 g	700/1010	0,428	0,350	81,78 %	0,006	—	—	300 „ „ „
22. II.-1. III.	2305 g	620/1011	0,403	0,315	77,40 %	0,0056	—	0/0 saurer Schwefel	300 „ „ „
2.- 4. III.	2330 g	720/1011	0,466	0,420	90,07 %	0,007	0,396	0,273	300 „ „ „
5.-7. III.	2325 g	760/1011	0,532	0,473	88,85 %	0,021	0,38	0,276	300 gem. Futter täglich + 30 Chlorformwasser
8.-11. III.	2295 g <sup>1)</sup>	910/1011	0,875	0,767	88,15 %	0,021	0,323	0,238	300 gem. Futter + 30 Chlorformwasser 8. III. 35 Chlorformwasser
12.-14. III.	2300 g	640/1010	0,472	0,420	88,86 %	0,014	0,277	0,207	300 gem. Futter täglich
15.-17. III.	2320 g	660/1011	0,411	0,378	90,17 %	0,007	0,343	0,243	300 „ „ „
18.-20. III.	2320 g	740/1009	0,346	—	—	—	—	—	300 „ „ „

1) Periode von 4 Tagen.

### III. Weisses Kaninchen. Gewicht 2885 g.

Datum	Harn, Menge und spezifisches Gewicht	Gewicht des Thieres	Gesamt- N-Ausfuhr täglich	N in Form von Harnstoff ausge- schieden täglich	Procent Harnstoff im Vergleich zum Gesamt-N	N in Form von Am- moniak ausge- schieden täglich	Gesamt- S-Aus- scheidung täglich als H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Gesamt- Schwefelsäure- ausscheidung täglich berechnet	Bemerkungen
13.-15. II.	550/1011	2770 g	0,484	—	—	—	—	—	300 gem. Futter täglich
16.-18. II.	620/1011	2750 g	0,569	—	—	—	—	—	300 gem. Futter täglich
19.-21. II.	660/1010	2770 g	0,481	0,455	94,7 %	0,0084	—	—	300 gem. Futter + 25,0 Aeq. dest. täglich
22.-24. II.	—	2730 g	0,516	0,411	79,65 %	0,007	—	—	300 gem. Futter + 25,0 Aeq. dest. täglich
25.-27. II.	620/1011	2750 g	0,569	0,500	87,97 %	0,007	—	—	300 gem. Futter + 25,0 Aeq. dest. täglich
28. II.-2. III.	610/1012	2750 g	0,613	0,487	79,51 %	0,0029	—	—	300 gem. Futter + 25,0 Chloroformwasser
3.-5. III.	670/1011	2780 g	0,613	0,553	90,03 %	0,007	0,350	0,284	300 gem. Futter + 25,0 Aeq. dest. täglich
6.-8. III.	650/1010	2610 g	0,621	0,530	85,29 %	0,0126	—	—	300 gem. Futter + 30 Chloroformwasser täglich. 8. III. 35 Chloroformwasser
9.-11. III.	630/1010	2700 g	0,770	0,702	92,08 %	0,007	0,313	0,226	300 gem. Futter täglich
12.-14. III.	680/1013	2650 g	0,875	0,851	97,13 %	0,007	0,368	0,299	300 „ „ „
15.-17. III.	600/1012	2600 g	0,481	0,432	89,67 %	0,006	0,357	0,277	300 „ „ „
18.-20. III.	650/1010	2610 g	0,275	0,243	88,28 %	0,0056	0,282	0,197	300 „ „ „
21.-23. III.	660/1010	2590 g	0,508	—	—	—	—	—	300 „ „ „

mittlere Stickstoffausscheidung war beim Kaninchen II vom 18. II. bis 4. III. (also vom Tage nach Erreichung der constanten Stickstoffausfuhr bis zur Verabfolgung des Chloroformwassers) 0,453, beim Kaninchen III vom 13. bis zum 24. II. 0,524. Das Chloroformwasser hat nun einen viel geringeren Einfluss auf die Stickstoffausscheidung gehabt als beim Hund. Während beim letzteren, wenn wir pro Kilogramm Körpergewicht 6,2 Chloroformwasser gaben, die Stickstoffausfuhr von 16,3 auf 20,89, also ungefähr um 25% steigt, haben wir beim Kaninchen, wenn wir ebenso lange 10,9 Chloroformwasser pro Kilogramm Körpergewicht geben, die Stickstoffausfuhr von 0,453 auf 0,532 (Nr. II), also um 15% erhöht, und wenn wir 8,7 pro Kilogramm Körpergewicht geben, eine Steigerung von 0,524 auf 0,613 (Nr. III), also um beinahe ebenfalls 15%.

Ob diese Steigerung der Stickstoffausfuhr in der That eine grössere am 2. und 3. Tage der Periode war und nur durch ein anfängliches Sinken maskirt wurde (wofür vielleicht der Versuch Nr. I spräche), ist nicht wahrscheinlich. Denn beim Kaninchen Nr. III erreicht die Stickstoffausfuhr erst in der zweiten Periode, in der kein Chloroformwasser mehr gegeben war (12.—14. III.), ihren Höhepunkt, kann also am 2. oder 3. Tage der ersten Chloroformperiode nicht schon höher gewesen sein, als sie aus den 3 Tagen berechnet wurde.

Eine bedeutende Steigerung der Stickstoffausfuhr erreichen wir erst, wenn 13,1 bis 15,3 bzw. 10,4 bis 12,2 g Chloroformwasser pro Kilogramm Körpergewicht mehrere Tage gegeben sind (auf 0,875 = 48% bzw. 40%). Die Stickstoffausfuhr ist unter Umständen verzögert und das Maximum kann erst dann erreicht sein, wenn schon tagelang kein Chloroformwasser mehr gegeben ist (Nr. III).

Dass die Thiere, nachdem die Einwirkung des Protoplasmagiftes aufgehört hat, abnorm wenig Stickstoff ausscheiden (0,346 und 0,275), um das Manco zu decken, ist nicht auffallend.

Rücksichtlich der Harnstoffausfuhr ist zu bemerken, dass beide Versuche nicht mit dem von Harnack und Remertz erhaltenen Resultat übereinstimmen. Zieht man zunächst die

absoluten Zahlen für den Harnstoff in Betracht, so bemerkt man in beiden Fällen eine bedeutende Steigerung der Harnstoffausfuhr von 0,375 bezw. 0,455 im Mittel vor der Verabreichung des Chloroformwassers auf 0,767 bezw. 0,851 nach Erreichung der vollen Wirkung des Protoplasmagiftes. Diese Zahlen sprechen schon allein dagegen, dass die Mehrausscheidung des Stickstoffs ganz oder zum grossen Theil auf Rechnung eines andern Körpers, wie Harnstoff, zu setzen ist. Zieht man die relativen Zahlen für den Harnstoff in Betracht, so ist allerdings auffallend, dass in diesen beiden Versuchen, wie im I, die Procentzahlen für den Harnstoff (im Vergleich zum Gesamt-N) so bedeutenden Schwankungen unterworfen sind. Eine Erklärung für dieses Verhalten fehlt mir. Ich möchte nur noch bemerken, dass die angegebenen Zahlen auf Grund gut stimmender Doppelanalysen gewonnen sind. Im Mittel beträgt die Procentzahl für den Harnstoff bei fehlender Chloroformwasserwirkung 84,41 bezw. 88,05 gegenüber einer Ausscheidung von 83,15 und 97,15% auf der Höhe der Chloroformwasserwirkung.

Die Zahlen für Ammoniak weisen dieselben niedrigen Werthe wie im I. Versuche auf.

In 5 bezw. 6 Perioden habe ich auch die Schwefelausscheidung, und zwar den sauren und den Gesamtschwefel bestimmt. Wenn sich das beim Fleischfresser oft constatirte Verhalten, dass bei gesteigerter Stickstoffausfuhr der neutrale Schwefel im Verhältniss zum sauren erheblich zunimmt, beim Pflanzenfresser nicht findet, so kann beim Pflanzenfresser von vornherein nicht davon die Rede sein, dass die vermehrte N-Ausscheidung auf der vermehrten Ausscheidung eines N- und S-haltigen Körpers beruhen könnte. Ich habe nun in der That in meinen Versuchen eher eine Zunahme des sauren wie des neutralen Schwefels constatiren können. Doch möchte ich auf die für den Schwefel erhaltenen Zahlen aus folgendem Grunde nicht allzuviel Gewicht legen. Wie ein Blick auf die Tabellen lehrt, sind die Zahlen für den Schwefel im Verhältniss zum Stickstoff ungemein hoch, sie betragen z. B. beim Versuch I vom 2.—4. III. 27% der Stickstoffausfuhr und vom

sind diese hohen Schwefelwerthe offenbar durch die verhältnissmässig grosse Schwefelaufnahme mit der Nahrung. Ich fand in 300,0 gemischten Futters 0,55 und 0,51 Schwefel als  $H_2SO_4$  ausgedrückt. Beim Hunde, der durch Fleisch und Fett ins Stickstoffgleichgewicht gebracht ist, steht im Harn der Schwefel zum Stickstoff in einem ganz bestimmten Verhältniss, nämlich in dem Verhältniss, in welchem sich beide Elemente im Eiweissmolekül finden. Auch beim Menschen, der neben Fleisch und Fett Amylaceen geniesst, ist dieses Verhältniss ziemlich gewahrt, da die mit der Nahrung eingeführte Schwefelsäure neben dem aus dem Eiweiss stammenden Schwefel wenig in Betracht kommt. Wir können deshalb auch in diesen Fällen aus dem Verhältniss des sauren zum neutralen Schwefel einen Schluss auf die Oxydationsvorgänge im Organismus machen. Anders ist es dagegen nach der oben mitgetheilten Erfahrung mit dem im Stickstoffgleichgewicht bzw. in gleichmässiger Stickstoffausscheidung befindlichen Pflanzenfresser. Hier hängt selbstverständlich die hohe Schwefelausscheidung nur von der gewählten Nahrung ab. So ergab sich in den Versuchen von E. Salkowski<sup>1)</sup> an Kaninchen, welche mit Kartoffeln gefüttert wurden, das Verhältniss  $H:N=1:12,5; 13,2; 12,8$  u. s. w. Das aus Kohl, Rüben und Kartoffeln gemischte Futter wählten wir, weil die Kaninchen Kartoffeln allein für längere Zeit schlecht fressen. Dass die gewählte Nahrung einen so hohen Gehalt an schwefelhaltigen, nicht eiweissartigen Körpern aufweist, konnte nicht vorausgesehen werden.

Fasse ich die wesentlichen Punkte der Arbeit nochmals zusammen, so komme ich zu folgenden Schlüssen:

Protoplasmagifte bzw. Chloroformwasser bewirken beim Pflanzenfresser erst in erheblich grösserer Dosis als beim Fleischfresser eine Steigerung der Stickstoffausfuhr. Die Wirkung des Giftes überdauert seine Einführung unter Umständen um mehrere Tage. Bisweilen scheint es vor der Steigerung

---

1) Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. I, S. 18ff.

der Stickstoffausfuhr zu einer Herabsetzung derselben zu kommen.

Die vermehrte Stickstoffausfuhr wird durch eine vermehrte Harnstoffausfuhr bewirkt.

Der Schwefelgehalt des Harns hängt beim Kaninchen in so hohem Grade von der Ernährung ab, dass auch bei Thieren, die constante Harnstoffausscheidung zeigen, die äusserste Vorsicht bei Schlussfolgerungen nach dieser Richtung geboten ist.

Herrn Professor E. Salkowski fühle ich mich für die Ueberlassung des Themas und für seinen liebenswürdigen Rath bei Aufstellung der Versuche zu lebhaftem Dank verpflichtet.

---



## Ueber das Bilifuscin.

Von

Dr. Leo R. v. Zumbusch.

---

(Aus dem Universitäts-Laboratorium für medicinische Chemie in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 25. November 1900.)

---

Die Gallensteine des Menschen sind bekanntlich, wenn sie überhaupt Farbstoffe enthalten, in der Regel nicht eben reich an Bilirubin; sie enthalten vielmehr braunen und grünen Farbstoff in grösserer Menge. Die Versuche, letztere zu isoliren, haben wohl eine Vermehrung der Nomenclatur, für keinen der Farbstoffe aber die sichere Charakterisirung als Individuum zur Folge gehabt. Der bestgekannnte dieser Körper, ich nenne Bilifuscin, Biliprasin, Bilicyanin, Bilihumin, ist das Bilifuscin.

Durch die Güte des Herrn Professor Ludwig wurden mir nun etwa 4 kg menschliche Gallensteine, die im pathologisch-anatomischen Institut des k. k. allgemeinen Krankenhauses zu Wien gesammelt worden waren, zur Verfügung gestellt, so dass ich in der Lage war, diesen Farbstoff reiner, als es früher der Fall gewesen war, darzustellen und zur Analyse zu bringen.

Es liegen über die chemische Natur des Bilifuscins zwei verschiedene Arbeiten vor, deren Ergebnisse nicht übereinstimmen. Die eine rührt von Brücke,<sup>1)</sup> die andere von Städeler<sup>2)</sup> her. An die Arbeit von Brücke schliesst sich

---

<sup>1)</sup> Wiener medicinische Zeitung, 4. Jahrgang, Heft 44 vom 1. November 1859.

<sup>2)</sup> Annalen für Chemie und Pharmacie, neue Reihe, Band 56 vom Jahr 1864.

eine aus dessen Laboratorium stammende Arbeit von Simony<sup>1)</sup> an.

Die von den genannten Autoren verwendeten Präparate waren auf verschiedene Weise dargestellt und zeigten verschiedene Eigenschaften.

Brücke's Bilifuscin war durch Ausschütteln menschlicher Galle mit Chloroform, Abdestilliren des von der Galle getrennten Chloroforms, Ausziehen des Rückstandes mit absolutem Alkohol, Ausfällen der eingeeengten Lösung mit Aether und Waschen des Niederschlags mit demselben dargestellt.

Es war ein braunes, sich in Alkohol leicht mit Olivfarbe lösendes Pulver; der Gmelin'schen Gallenfarbstoffreaction gegenüber verhielt es sich negativ, eine Elementaranalyse wurde nicht gemacht.

Städeler extrahirte mit Aether von Cholestearin und Fett befreite und mit Salzsäure entkalkte Gallensteine mit Chloroform und behandelte den Rückstand mit Alkohol; die alkoholische Flüssigkeit verdampfte er und zog den Abdampfrückstand mit Aether aus, worauf er durch wiederholtes Lösen in Alkohol reinigte.

Das gewonnene Präparat war ebenfalls schwarzbraun und leicht, mit brauner Farbe, in Alkohol löslich. Städeler gibt an, Bilifuscin gebe die Gallenfarbstoffreactionen ebenso schön und deutlich wie Bilirubin.

Was die Zusammensetzung betrifft, gibt der Autor auf Grund der Elementaranalyse die Formel  $C_{16}H_{30}N_2O_4$  an, welche sich von der des Bilirubins durch ein Plus von einem Molekül Wasser unterscheidet.

Demnach haben die zwei als Bilifuscin bezeichneten Präparate wohl gewisse Eigenschaften gemeinsam, jedoch zeigen sie auch sehr bemerkenswerthe Unterschiede.

Ich habe das dieser Untersuchung zu Grunde liegende Präparat auf folgende Weise dargestellt: Die gröblich zerstoßenen Gallensteine wurden zuerst durch Extraction mit

---

1) Sitzungsbericht der Wiener Akademie vom Jahre 1876.

zurückbleibende Pulver wurde sodann auf dem Filtrum solange mit Wasser gewaschen, bis dasselbe klar und farblos abfloss. Die ersten, stärker braun gefärbten Waschwässer ergaben eingedampft einen braunen, leimartig riechenden und zu spröden Krusten eintrocknenden Körper, welcher keine Gallenfarbstoffreaction zeigte.

Das mit Wasser erschöpfte braune gröbliche Pulver wurde hierauf mit 5%iger Salzsäure behandelt; hierbei ging eine ziemliche Menge von Kalk unter Aufbrausen in Lösung (es trat hierbei kein Geruch nach Schwefelwasserstoff auf) und das früher sandartige, aus harten Körnern bestehende Pulver wurde dadurch zu einem äusserst feinen, stark abfärbenden Pulver umgewandelt. Es trat dabei ein charakteristischer Geruch nach Galle, wenn auch nur ganz schwach, auf.

Nachdem durch Waschen mit Wasser die Salzsäure wieder entfernt war, wurde das Pulver getrocknet und zur Darstellung der einzelnen Gallenfarbstoffe verwendet.

Das Gewicht der Masse betrug nach Beendigung der oben beschriebenen Prozesse etwa 300 g; zuerst wurde das Präparat nun einer Extraction mit Chloroform unterzogen, welche im Soxhlet'schen Apparate vorgenommen wurde. Stets wurde nur Chloroform verwendet, welches durch wiederholtes Schütteln mit Wasser und nachheriges Abdestilliren über Chlorcalcium gereinigt worden war.

Trotz mehrere Wochen andauernder Extraction konnte es nicht dahin gebracht werden, dass das Chloroform ungefärbt abfloss. Von dem Extract wurde das Chloroform abdestillirt und der Rückstand, nachdem er vollständig von Chloroform befreit worden war, mit absolutem Alkohol übergossen und dieser so oft gewechselt, als er sich noch olivenbraun färbte. Nach mehrmaligem Erneuern des Alkohols nahm derselbe eine röthliche Farbe an, welche er dem Bilirubin, das sich in geringem Maasse darin löst, verdankt. Der Alkohol wurde von dem äusserst fein vertheilten Bilirubin durch Decantation getrennt; erst nachdem dies mehrmals wiederholt war, wurde der Rest durch Filtriren entfernt.

Auch das mit Chloroform fast vollständig erschöpfte Pulver wurde nach Austreibung des Chloroforms mit Alkohol behandelt, welcher sich ebenso olivbraun färbte wie der Alkohol, mit welchem der Chloroformextract behandelt wurde. Die gesammten alkoholischen Auszüge wurden vereinigt und destillirt. Der überbleibende Rückstand war dunkelbraun gefärbt, zum Theil krystallinisch, und hatte einen Geruch, welcher dem von ranzigem Fette nicht unähnlich war. Er wurde durch mehrmaliges Kochen mit Wasser vom Alkohol gänzlich befreit, wobei er an das Wasser keinen Farbstoff abgab, indem die geschmolzene Masse wie Oeltropfen auf dem heissen Wasser schwamm.

Nachdem das Wasser abgegossen worden war, wurde der getrocknete Extract in wenig Chloroform gelöst, was leicht von Statten ging, und die Lösung filtrirt. Der filtrirten Lösung wurde die etwa zwanzigfache Menge von Aether zugesetzt. Schon nach kurzer Zeit war die Farbe des Gemisches erheblich heller braun geworden und es setzte sich ein Niederschlag ab. Dieser wurde auf ein gehärtetes Filter gebracht und mit Aether gewaschen, welcher dabei keine Färbung annahm.

Das Aetherchloroformgemisch, das noch ziemlich stark braun gefärbt war, wurde abdestillirt; der Rückstand, der dem oben beschriebenen vollständig glich, wurde wieder mit Aether behandelt, wobei sich ein Theil löste, der andere als schwarzer blätteriger Belag ungelöst zurückblieb; der letztere, sowie der abermals eingedampfte in Aether lösliche Antheil wurden aufbewahrt.

Die durch den Aether ausgefällte Substanz in der Menge von ungefähr 12 g war schwarz, porös und liess sich sehr leicht zu einem feinen schwarzen Pulver zerreiben.

Auf dem Striche war die Farbe schwarz mit einem Stich ins Grünliche. Unter dem Mikroskop betrachtet, erwies sie sich als aus unregelmässigen Krümeln bestehend; es konnte keine Spur einer krystallinischen Structur nachgewiesen werden. Das so dargestellte und beschaffene Bilifuscin wurde zu allen Versuchen verwendet.

auch durch Aether aus seiner Lösung in Chloroform nicht leicht gefällt wird, dürfte eine nennenswerthe Verunreinigung unseres Präparates mit Bilirubin nicht zu befürchten sein. Als Bilihumin wird der in den angewendeten Lösungsmitteln unlösliche Rückstand bezeichnet, der also hier nicht in Betracht kommt.

Dieses Bilifuscin ist absolut unlöslich in kaltem und heissem Wasser, in verdünnten Mineralsäuren, in Schwefelkohlenstoff, Petroleumäther, Aethyläther, Benzol und Nitrobenzol, wenig löslich in Chloroform, Methyl- und Amylalkohol sowie Aceton, ein wenig besser in Aethylalkohol, ziemlich gut in Eisessig, Naphtalin und Dimethylanilin, am besten in Pyridin. Es konnte also wohl die Angabe Städeler's bestätigt werden, dass sich die unreine Substanz leicht in Chloroform löse, die reine aber nicht, dagegen fand ich im Gegensatz zu dessen Angabe, dass sich der reine Körper nur recht mässig in Alkohol auflöst.

In alkalischen Flüssigkeiten löst sich der Körper mit tiefbrauner Farbe leicht auf und wird durch Ansäuern in braunen Flocken aus denselben gefällt. Auch durch Zusatz von Bleiessig, Barytwasser und Chlorcalcium wird er in braunen Flocken gefällt.

Versuche, den Körper aus Dimethylanilin und aus Pyridin zu krystallisiren, gelangen nicht; aus Dimethylanilin, dessen sich Küster<sup>1)</sup> mit Erfolg bedient hat, schied sich der Körper in kugel- und stäbchenförmigen Partikeln ab, aber nicht in irgend welchen kennbaren Krystallformen; die Substanz schmilzt glatt bei 183°.

Der Körper verhält sich sowohl der Huppert'schen Gallenfarbstoffreaction, als auch der Gmelin'schen und deren Modificationen von Brücke, Fleische und Rosenbach gegenüber vollständig negativ, es trat nicht die geringste Spur einer Grünfärbung auf, so dass hierdurch die Angaben Brücke's bestätigt erscheinen. Dieselben Reactionen, jedesmal

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Band XXVI, S. 317.

parallel mit viel stärker verdünnten Bilirubinlösungen ausgeführt, traten sehr schnell und deutlich auf.

Gefrierpunktserniedrigungsversuche nach Raoult, mit Lösung der Substanz in Naphtalin und Eisessig, ergaben kein brauchbares Resultat.

Die alkoholische Lösung des Körpers zeigt keine scharfen Absorptionsstreifen, sondern bloss eine je nach der Concentration der Lösung verschieden starke Verdunkelung beider Enden des Spectrums, vorzüglich des violetten.

Erhitzt man die Substanz auf dem Platinblech, so bläht sie sich auf und verschwindet allmählich, ohne Rückstand zu hinterlassen. Ein charakteristischer Geruch konnte hierbei nicht beobachtet werden.

Zur Prüfung auf Chlor wurde nach der Vorschrift Beilstein's eine Probe mit Kupferoxyd gemischt in der Flamme des Bunsenbrenners erhitzt, wobei keine Grünfärbung eintrat.

Durch Zusammenschmelzen der Substanz mit Kalium und Prüfen der im Wasser gelösten Schmelze mit Nitroprussidnatrium wurde die Abwesenheit von Schwefel constatirt. Wird der Körper mit metallischem Kalium erhitzt, die Masse mit Wasser extrahirt, dem Filtrat Eisenvitriol, Eisenchlorid und Salzsäure zugesetzt, so entsteht alsbald deutliche Blaufärbung und nach einigem Stehen scheiden sich blaue Flocken in ziemlicher Menge ab.

Der Elementaranalyse wurde stets das unmittelbar vorher durch eine Stunde bei einer Temperatur von 105 bis 110° getrocknete Präparat unterworfen.

Das Resultat war folgendes:

Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff durch Verbrennung mit vorgelegtem Kupfer:

I. Angewandte Substanz 0,2280 g,  
daraus : 0,1807 g  $H_2O$  = 0,0201 g H = 8,81% Wasserstoff  
und 0,5452 g  $CO_2$  = 0,1469 g C = 64,43% Kohlenstoff.

II. Angewandte Substanz 0,1370 g,  
daraus : 0,0954 g  $H_2O$  = 0,0106 g H = 7,74% Wasserstoff  
und 0,3230 g  $CO_2$  = 0,0881 g C = 64,33% Kohlenstoff.

daraus: 0,1055 g  $H_2O$  = 0,0117 g H = 8,19% Wasserstoff  
und 0,3397 g  $CO_2$  = 0,0926 g C = 64,84% Kohlenstoff.

- IV. Angewandte Substanz 0,1607 g,  
daraus: 0,1108 g  $H_2O$  = 0,0123 g H = 7,65% Wasserstoff.  
Der Stickstoff wurde nach Dumas bestimmt:

- I. Angewandte Substanz 0,2131 g.  
Barometerstand 740 mm., Temperatur 14,1°  
Volumen des Stickstoffs 15,5 ccm. entsprechend 8,33% Stickstoff.

- II. Angewandte Substanz 0,1135 g.  
Barometerstand 745 mm., Temperatur 13,0°  
Volumen des Stickstoffs 8,00 ccm. entsprechend 8,17% Stickstoff.

Die Mittel aus diesen Werthen sind:

Wasserstoff 8,10%  
Kohlenstoff 64,53%  
Stickstoff 8,25%

Auf Sauerstoff entfallen also 19,12%.

Städeler hat für sein Bilifuscin die der Formel des Bilirubins so nahe stehende Formel  $C_{16}H_{20}N_2O_4$  angegeben, und diese entspricht einer anderen procentischen Zusammensetzung, nämlich:

$C_{16}H_{20}N_2O_4$   
C 63,16%  
H 6,58%  
N 9,21%  
O 21,05%.

Die der oben angegebenen procentischen Zusammensetzung des Körpers am besten entsprechende Formel ist



Die aus dieser Formel berechneten Zahlen verhalten sich zu den bei der Analyse gefundenen wie folgt:

gefunden: 64,53% C	berechnet: 64,65% C
8,10% H	8,09% H
8,25% N	8,25% N
19,12% O	19,02% O.

Der hohe Gehalt an Wasserstoff scheint auffällig, da die Autoren für alle anderen Gallenfarbstoffe, selbst für das Hydrobilirubin Maly's, das am meisten Wasser enthält, einen viel geringeren Gehalt an Wasserstoff angeben. Doch glaube ich

nicht, dass die Substanz, welche zur Verbrennung verwendet wurde, Wasser enthalten habe; denn erstens war dieselbe, nachdem sie mit Aether aus der Lösung in Chloroform gefällt worden, stets im evacuirten Exsiccator über Schwefelsäure aufbewahrt, und zweitens wurde sie auch unmittelbar vor der Verbrennung im Trockenkasten bei 105 bis 110° getrocknet, und zwar durch eine Stunde; hierbei zeigte sie niemals nennenswerthen Gewichtsverlust.

Es wurden nun mit dem Präparate die folgenden Versuche angestellt:

Eine Portion der Substanz wurde in alkalischer Lösung mit übermangansaurem Kali oxydirt, die Flüssigkeit vom Manganhyperoxyd abfiltrirt, das Filtrat angesäuert und mit Aether geschüttelt. Nach Abdunstung des Aethers blieb eine geringe Menge gelblichen, schmierigen, nicht krystallisirten Rückstandes, der sich der Pettenkofer'schen Gallenfarbstoffreaction gegenüber negativ verhielt. Eine andere Portion wurde mit 20%iger Salzsäure im zugeschmolzenen Glasrohr durch 9 Stunden auf 145° erhitzt, dann wurde die Flüssigkeit filtrirt, eingedampft, der Rückstand mit Alkohol aufgenommen, der Alkohol verdampft, der Rückstand in Wasser gelöst, mit Thierkohle entfärbt, und die filtrirte Flüssigkeit mit Platinchloridlösung versetzt. Der nach 24 Stunden gebildete Niederschlag wurde abfiltrirt, getrocknet, gewogen und durch Verglühen der Platingehalt bestimmt.

Es betrug das Gewicht des Niederschlags: 0,0305 g  
des darin enthaltenen Platins: 0,0121 g.  
das sind 39,67%.

Es enthält nun Dimethylammoniumplatinchlorid 41,20%  
und Trimethyl „ „ „ 38,97%,  
also steht der erhaltene Werth dem letzteren am nächsten.

Setzt man einer hellbraun gefärbten Lösung unseres Bilifuscins in Pyridin Hydrazinhydrat zu, so entsteht während 24stündigen Stehens eine eigenthümliche goldgelbe Verfärbung der Lösung.

Setzt man einer ammoniakalischen Lösung Hydrazinhydrat zu, so tritt dieselbe Erscheinung auf, jedoch etwas langsamer.



auch der Versuch gemacht, den Stickstoff nach der Kjeldahnschen Methode zu bestimmen, wobei es sich aber zeigte, dass nach dem Zerstören der Substanz mit rauchender Schwefelsäure beim Destilliren der sauren Flüssigkeit mit überschüssiger Kalilauge kein Ammoniak in die vorgelegte Normalschwefelsäure gelangte.

Der Versuch wurde wiederholt, indem zuerst die Substanz nur in Schwefelsäuregemisch zerstört wurde, während bei späteren Versuchen die verschiedenen Zusätze, wie metallisches Quecksilber und übermangansaures Kali, sowie andere Oxydationsmittel, beigegeben wurden. Jedesmal wurden etwa 2 Decigramm Substanz verwendet.

Das Resultat war stets das nämliche, indem die vorgelegte Säure und eine gleich grosse zur Kontrolle dienende Säuremenge gleich viel Lauge zur Neutralisation brauchte. Da bei diesen Versuchen alle nöthigen Vorsichtsmassregeln angewendet waren, und man daher nicht an ein Uebersehen des Ammoniaks zu denken hatte, so wurde daran gegangen, zu suchen, wohin der Stickstoff bei der Zersetzung gekommen sei.

Auffallender Weise lässt sich der im Bilirubin enthaltene Stickstoff mittelst der Kjeldahl'schen Methode anstandslos bestimmen, wie folgender Versuch zeigt, den ich mit von mir dargestelltem krystallisirten Bilirubin angestellt habe.

Angewandte Substanz 0,3045 g,

daraus Ammoniak 0,0343 g

oder N 0,0283 g,

das ist 9,3% N, während nach der gebräuchlichen Formel 9,79% N im Bilirubin enthalten sind.

Um nun die Form zu finden, in der der Stickstoff auf der Zersetzung mit rauchender Schwefelsäure hervorgehoben wurden folgende Versuche gemacht:

Fürs Erste wurde, um zu sehen, ob der Stickstoff nicht in Form irgend eines mit Lauge zu bindenden Körpers auf der kochenden Schwefelsäure entweiche, folgender Versuch zusammengestellt:

Ein Kolben aus hartem Glase, von der Grösse der g

wöhnlichen, zu den Kjeldahl'schen Analysen verwendeten Kolben, mit circa 30 cm. langem Halse, erhielt am Ende desselben aussen einen Schliff, auf den ein Gluckapparat von der Form eines kleinen Péligot'schen Apparates aufgeschliffen wurde, der sich an einem 25 cm. langen Ansatzrohre befand, das mit dem Halse des Kolbens einen stumpfen Winkel einschloss.

Der Gluckapparat wurde nun mit reinster Kalilauge entsprechend gefüllt, der Kolben mit Säure und Substanz beschickt, und dann bis zur vollständigen Entfärbung gekocht.

Sodann wurde der Apparat auseinandergenommen und die saure Flüssigkeit zu einer gewöhnlichen Ammoniakbestimmung verwendet, die ein vollständig negatives Resultat ergab. Zweitens wurde die Lauge auf Beimengungen aus den Zersetzungsprodukten geprüft, wobei ich Folgendes bemerken möchte: Bis zur Entfärbung war der Apparat etwa acht Tage jeden Tag mehrere Stunden in Gang gewesen, während Nachts die Flamme verlöscht war. In Folge dessen strömten jedesmal nach dem Anzünden ziemlich viele Gasblasen durch die Lauge heraus, während beim Erkalten Luft in reichlicher Menge zurückgesogen wurde. Hierdurch kamen die gebildeten Gase wohl zum überwiegenden Theile mit der Lauge in Berührung.

Die vorgelegte Lauge, deren alkalische Reaction nach Beendigung des Versuchs geprüft war, wurde nun aus dem Apparat herausgespült und die Flüssigkeit auf 250 ccm. ergänzt. Dann wurden folgende Untersuchungen mit derselben vorgenommen:

1. mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert, mit Metaphenylendiamin auf salpetrige Säure geprüft: mit negativem Ergebniss;

2. wurde mit concentrirter Schwefelsäure und Diphenylamin auf Salpetersäure untersucht, ebenfalls mit negativem Resultat.

3. 50 ccm. wurden mit Eisenoxyd und Oxydulsalz und Salzsäure auf Bildung von Berlinerblau geprüft, es trat selbst nach tagelangem Stehen keine Spur einer Blaufärbung auf.

4. Auch der Versuch, mit Schwefelammonium und Eisenchlorid Cyanverbindungen nachzuweisen, ergab ein negatives Resultat.

5. Endlich wurde noch die Möglichkeit ins Auge gefasst, dass sich aus etwa entstandenen Cyanverbindungen beim Eintritt in die Lauge oxalsaures Ammon gebildet haben könne.

Zu diesem Zwecke wurde die noch übrige Portion mit Chlorbaryum gefällt, der gesammelte Niederschlag mit kalter, verdünnter Salzsäure gewaschen, die Waschflüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht, der ziemlich reichlich entstandene Niederschlag gesammelt, getrocknet, mit concentrirter Schwefelsäure in einem Röhrchen erhitzt, von wo aus das entwickelte Gas über Kalilauge geleitet wurde; dieses Gas wurde versucht anzuzünden, um zu sehen, ob Kohlenoxyd gebildet sei, was jedoch nicht gelang. Um nun noch zu sehen, ob nicht etwa Gase gebildet würden, welche von Säure zurückgehalten würden, wurde bei der Wiederholung des Versuches in das frei endende Rohr des Gluckapparates mittelst einer Kautschukstopfe ein zweiter, viel kleinerer, hierzu geeignet geformter Gluckapparat dicht eingesetzt und mit 2 ccm. Normalschwefelsäure beschickt.

Nach Beendigung der Zersetzung wurde mit der im Kolben befindlichen Schwefelsäure eine Ammoniakbestimmung, mit der Lauge alle oben angeführten Versuche gemacht; beides mit demselben negativen Resultat. Sodann wurden die 2 ccm. Normalschwefelsäure titirt, im Vergleich mit 2 ccm., die am selben Tage entnommen und aufbewahrt worden waren. Hierbei ergab sich keine Differenz, was mit ziemlicher Sicherheit ausschliesst, dass oxalsaures Ammon in der Lauge aus Cyanverbindungen gebildet worden sei.

Keiner von all diesen Versuchen hat also erklärt, was mit dem Stickstoff geschieht, wenn man die Substanz mit rauchender Schwefelsäure zerstört, während doch die Analyse nach Dumas 8,25% Stickstoff ergab.

Allerdings sind verschiedene Bindungsformen des Stickstoffs und mehrere Gruppen von organischen Körpern bekannt, welche mit der Kjeldahl'schen Methode kein Ammoniak liefern.

Wenn man jedoch die einzelnen über diesen Gegenstand handelnden Arbeiten der verschiedenen Autoren, wie die von Asboth, Arnold, Dafert, Jodlbauer, die Arbeiten von Gunning<sup>1)</sup> über die Resultate, welche er mittelst der von ihm angegebenen Modificationen der Methode erzielte, sowie insbesondere die Arbeit von Karl Arnold und Konrad Wedemeyer<sup>2)</sup> über die Brauchbarkeit der Kjeldahl-Methode und der von ihnen bevorzugten Modificationen mit den verschiedenen Zusätzen, vergleicht, so findet man fast so viel verschiedene Ansichten als Arbeiten.

Die letztgenannte Arbeit umfasst zahlreiche Versuche mit verschiedenen Zusätzen zur Schwefelsäure, um den Stickstoff der zu zerstörenden Substanzen in Ammoniak zu verwandeln, und erklärt die Gunning'sche Methode in der von Arnold angegebenen Modification für die am öftesten zum Ziel führende.

Doch erhielten die Verfasser auch mit dieser Methode durchaus nicht in allen Fällen brauchbare Resultate. Sie kamen durch ihre grossen, mit den mannigfachsten Substanzen, welche Stickstoff auf die verschiedenste Weise gebunden enthalten, und mit verschieden modificirter Versuchsanordnung angestellten Versuchsreihen zu dem Schlusse, dass die Anwendbarkeit der Methode insofern von der Bindungsform des Stickstoffs abhängig sei, dass die Schwierigkeit, den Stickstoff in Ammoniak überzuführen, von der Entfernung der Stickstoffatome im Molekül abhängt.

Der Gunning'schen Modification sprechen sie viel grössere Verwendbarkeit zu, indem sie angeben, dass dieselbe gestatte, ringförmig gebundenen Stickstoff zu bestimmen, was mit der gewöhnlichen Methode nicht möglich ist; sie geben diesen Unterschied als Kennzeichen für die Bindungsform des Stickstoffs geradezu an.

Aus unserer Substanz waren nun mit gar keiner der am

---

1) Fresenius, Jahrbuch für analytische Chemie, Bd. 24 (1885) und folgende.

2) Fresenius, Jahrbuch für analytische Chemie, Bd. 31 vom Jahre 1892.

der Kjeldahl'schen Methode mehr als verschwindend kleine Mengen von Ammoniak gebildet worden, während es durch den deutlich positiven Ausfall der Lassaigne'schen Probe und durch das Ergebniss der Analyse nach Dumas bewiesen erscheint, dass die Substanz Stickstoff enthält.

Nun hatte der weiter oben beschriebene Versuch auch gezeigt, dass der Stickstoff weder als Salpetersäure, salpetrige Säure noch in Form einer Cyanverbindung entwichen war, indem uns ein einziges Mal eine positive Reaction auf Salpetersäure nach einem Versuche in der (reinen) vorgelegten Natronlauge beobachtet wurde, welche Reaction jedoch in derselben Flüssigkeit, nachdem sie einige Wochen aufbewahrt worden, nicht mehr vorhanden war.

Endlich wurden noch Versuche angestellt, um festzustellen, ob nicht bei der Zersetzung des Bilifuscins mit rauchender Schwefelsäure der Stickstoff als solcher abgeschieden würde.

Zu diesem Behufe wurden die bei der Zersetzung gebildeten Gase aufgesammelt und gasanalytisch bestimmt. Diese Versuche haben jedoch auch keine befriedigende Aufklärung gebracht, indem bei den einzelnen Versuchen verschiedene, jedoch niemals entsprechende oder annähernd entsprechende Mengen von Stickstoff nachgewiesen werden konnten.

Das wechselnde und zweifelhafte Ergebniss aller zum Zwecke der Aufklärung über die Zersetzung des Bilifuscins nach der Kjeldahl'schen Methode angestellten Versuche ist wenig geeignet, diese Vorgänge aufzuklären.

In dem Verhalten des Bilifuscins bei dessen Zersetzung nach Kjeldahl's Methode liegt nun ein wichtiger Unterschied gegenüber dem Bilirubin, welches, wie oben beschrieben, durch rauchende Schwefelsäure leicht zersetzt wird und mit der Analyse nach Dumas übereinstimmende Resultate liefert.

Indem nun das Verhalten eines Körpers bei der Zersetzung nach Kjeldahl Anhaltspunkte für die Bindungsform des Stickstoffs gibt, so dürfte es nicht zweifelhaft sein, dass Bilirubin und Bilifuscin eine ganz verschiedene Constitution

besitzen, und dass das hier beschriebene Bilifuscin ein vom Bilifuscin Städelers total differenter Körper ist.

Auch ist ja der Unterschied der Zusammensetzung bedeutend zwischen den beiden gleichnamigen Körpern, wobei bereits weiter oben auf den auffallend hohen Wasserstoffgehalt hingewiesen worden ist.

Demnach stellt sich das Bilifuscin als ein zwar nicht krystallisirt erhaltener, aber durch Löslichkeit und andere beschriebene physikalische Eigenschaften wohl charakterisirter, die Formel  $C_{64}H_{96}N_7O_{14}$  besitzender, die gebräuchlichen Gallenfarbstoffreactionen nicht gebender Körper dar, dessen Stickstoff derartig gebunden ist, dass er nicht durch Zersetzung mit rauchender Schwefelsäure in Ammoniak übergeführt werden kann.

Nachdem diese Zeilen in keiner Weise als abgeschlossene Lösung der Aufgabe betrachtet werden können, werde ich mir erlauben, über die Ergebnisse noch anzustellender Untersuchungen seinerzeit zu berichten.

---

# Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden.

Von

Dr. Leo Schwarz (Prag).

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 42.)

(Der Redaction zugegangen am 27. November 1900.)

---

Bei der ungemeinen Reactionsfähigkeit der Aldehyde einerseits, der Eiweisskörper andererseits ist von vornherein zu erwarten, dass sie auf einander leicht einwirken. Nähere Angaben in dieser Richtung liegen aber nur in Betreff des Formaldehyds vor, der wegen seiner hohen Desinfectionswirkung und seiner Fähigkeit, Gewebe zu fixiren und in natürlicher Färbung zu erhalten, besondere Aufmerksamkeit auf sich gelenkt hat.

Blum<sup>1)</sup> in Frankfurt hat anscheinend zuerst die bemerkenswerthe Thatsache festgestellt, dass Eier- und Serumalbumin durch Zusatz von Formaldehyd seine Coagulirbarkeit in der Hitze einbüsst. Als weiteres Merkmal der so erhaltenen «Methylenverbindungen der Albumine» bezeichnete er deren Fällbarkeit durch Säuren, durch concentrirten Alkohol und durch Aceton bei erhaltener Löslichkeit auf neuerlichen Wasserzusatz. Bach<sup>2)</sup> brachte bald darauf eine Bestätigung dieser Angaben bei, Benedicenti<sup>3)</sup> ergänzte sie in mehrfacher Richtung. Er liess Gelatine, Fibrin, Casein, Blutserum und Eialbumin längere Zeit mit Formaldehydlösung in Berührung und constatirte titrimetrisch eine Abnahme des Formaldehydgehaltes der Lösung. Die «Formaldehydproteine» waren in

---

1) Diese Zeitschr., Bd. XXII, 1896/97, S. 127.

2) Archives des sciences physiques et naturelles. Bd. 3, 1897, S. 88.

3) Arch. f. Physiologie 1897, S. 219.

wesentlichen Eigenschaften vom Ausgangsmaterial verschieden. So wurde Gelatine gehärtet und unlöslich, Blutserum gallertig, Fibrin und Casein verloren ihre Quellbarkeit und wurden, ebenso wie auch das Eiereiweiss, unverdaulich. Durch Erhitzen im Dampfstrom wurde Formaldehyd wieder abgespalten und die Produkte gewannen ihre ursprünglichen Eigenschaften wieder.

Den im Nachfolgenden mitgetheilten Versuchen lag die Absicht zu Grunde, über die chemische Natur der Eiweissaldehydverbindungen Näheres zu erfahren. Um sicher zu gehen, war dazu nothwendig, als Ausgangsmaterial homogene krystallisirte Eiweisskörper zu benützen und die Versuche nicht auf den Formaldehyd zu beschränken.

## **I. Darstellung, Eigenschaften, Zusammensetzung von Aldehydeiweissverbindungen.**

### **A. Versuche mit krystallisirtem Serumalbumin.**

Zur Darstellung der Serumalbuminkrystalle aus Pferdeblutserum bediente ich mich des combinirten Ammonsulfatschwefelsäureverfahrens, wie es von Pemsel im hiesigen Institute ausgearbeitet worden ist.<sup>1)</sup> Die mindestens einmal umkrystallisirten Serumalbuminkrystalle wurden in möglichst wenig destillirtem Wasser gelöst und zur Entfernung des anhaftenden Ammonsulfats ausgiebiger Dialyse unterworfen.

#### **1. Einwirkung von Formaldehyd.**

In Verwendung kam das 40%ige «Formalin» des Handels. Wenige Tropfen dieser Formaldehydlösung reichen bereits hin, um einige Cubikcentimeter der Serumalbuminlösung beim Erhitzen uncoagulirbar zu machen. Man kann die Lösung beliebig lange im Kochen erhalten, ohne dass Trübung eintritt. Sowohl die gekochte, als die ungekochte Lösung bleibt beim Stehen unbegrenzte Zeit klar. Die Lösungen behalten ihre Ungerinnbarkeit beim Wiedererhitzen bei. Concentrirte Ammonsulfatlösung erzeugt Fällung noch vor Halbsättigung. Der Niederschlag ist in Wasser nicht so leicht löslich, wie ausgesalzenes Serumalbumin. Doch löst er sich vollständig.

---

<sup>1)</sup> Siehe Krieger, Ueber die Darstellung krystallinischer thierischer Eiweissstoffe. Inaug.-Diss. Strassburg 1898.



Fällung.<sup>1)</sup> Nur durch Alkoholäther ist eine flockige Ausfällung zu erzielen. Dieser Niederschlag ist nur frisch nach der Fällung und in grösserem Ueberschusse von destillirtem Wasser löslich, nach einigem Stehen oder nach Aufkochen geht er im Wasser nicht mehr in Lösung. Jedenfalls ist die Wasserlöslichkeit des Niederschlages gering. Aceton fällt nur unvollkommen. Der Niederschlag ist in Wasser unlöslich. Die Fällung durch Aceton scheint um so unvollständiger zu erfolgen, je länger der Formaldehyd auf das Serumalbumin eingewirkt hat.

Da das verwendete Formaldehydpräparat schwach sauer reagierte, musste an die Möglichkeit gedacht werden, dass diese saure Reaction bei der Ungerinnbarkeit in der Hitze eine Rolle spielt. Doch bleibt die Aldehydeiweisslösung auch nach dem Abstumpfen der sauren Reaction ungerinnbar.

Bei einem Versuche wurde in eine Serumalbuminlösung mit Soda neutralisirte Formaldehydlösung in kleinen Portionen eingetragen. Nachdem eine Probe noch Gerinnung gezeigt hatte, wurden weiter einige Cubikcentimeter Formaldehydlösung zugesetzt. Da erfolgte plötzlich diffuse Trübung mit nachfolgender Abscheidung eines flockigen Niederschlages. Dieser Niederschlag war in Wasser unlöslich, er ging auch weder in einem Säure- noch in einem Alkaliüberschuss in Lösung.

Trotz wiederholter Versuche ist es später nicht wieder gelungen, eine derartige Fällung zu erzielen.

Von den weiteren Reactionen, die mit der Formaldehydserumalbuminlösung angestellt wurden, seien die folgenden hier angeführt:

Chlorcalcium, Magnesiumsulfat: kein Niederschlag.

Eisenchlorid: Niederschlag, im Ueberschuss des Fällungsmittels löslich.

Kupfersulfat: leichte, wolkige Trübung.

Zinksulfat, Bleiacetat: dichte Fällung.

Essigsäure-Ferrocyankalium, Sublimat, Jodquecksilberkalium, Metaphosphorsäure, Tannin: massiger Niederschlag.

---

1) Auch Bach (l. c.) hat beobachtet, dass die Coagulirbarkeit seines Präparates durch Alkohol geringer war, als die des genuinen Eiweisses.

Kochen mit Natronlauge und Bleiacetat: Bräunung, beim Stehen reichliche Abscheidung von Schwefelblei.

Biuretprobe mit Kupfersulfat: Violettfärbung.

Millon'sche Reaction: positiv.

Xanthoproteinprobe: positiv.

Reactionen nach Molisch, Adamkiewicz, Liebermann: negativ.

Zahlreiche und mannigfach variirte Versuche, die Eiweiss-Formaldehydverbindung zur Krystallisation zu bringen, sind resultatlos verlaufen. Die Abscheidung erfolgte immer amorph.

Die zur Analyse bestimmten Präparate wurden aus salzfreier Serumalbuminlösung auf verschiedene Weise hergestellt. Bei der ersten Serie von Präparaten wurde sofort nach dem Aldehydzusatz mit Alkoholäther gefällt, der Niederschlag mit Wasser aldehydfrei gewaschen, dann nochmals mit Alkoholäther behandelt und schliesslich im evacuirten Exsiccator getrocknet. Auf die Trocknung bei 100° bis zur Gewichtskonstanz wurde verzichtet, nachdem die Erfahrung gelehrt hatte, dass bei dieser Procedur nicht nur Wasser weggeht, sondern auch Aldehyd abgespalten wird.

Bei einer zweiten Serie von Präparaten wurde die Alkoholätherfällung erst nach zweimonatlichem Stehen der Aldehydeiweisslösungen vorgenommen, sonst wie früher verfahren. Es galt zu untersuchen, ob längere Berührung des Eiweisses mit Aldehyd den Eintritt von Aldehydgruppen in das Eiweissmolekül begünstigt.

Benedicenti (l. c.) hat nämlich bis zur Grenze von ungefähr drei Wochen bei seinen titrimetrischen Bestimmungen um so weniger freien Formaldehyd in den Proben gefunden, je länger die verschiedenen Eiweisskörper mit dem Formaldehyd in Berührung gewesen waren. Auch Muraközy<sup>1)</sup> findet, dass die Wirkung des Formaldehyds auf Eiweisskörper bei längerem Stehen zunehme.

Die mit Formaldehyd hergestellten Präparate bilden ein farbloses Pulver, sind auffallend schwer löslich, schwerer als sonst coagulirtes Eiweiss. Beim Kochen mit Natronlauge tritt nur allmählig Lösung ein unter Gelbfärbung der Flüssigkeit.

---

<sup>1)</sup> Ref. im Jahresber. für Thier-Chemie Bd. 28, für 1898, S. 255.

beim Erwärmen nur mangelhafte Lösung.

Um sicher zu sein, dass den so gewonnenen Präparaten kein freier Aldehyd mehr anhafte, wurde mit einem Formaldehydpräparate die Bayer'sche Phloroglucinsalzsäurereaction<sup>1)</sup> zum Nachweise freien Formaldehyds angestellt. Die Reaction verlief negativ. Die Lösung färbte sich zwar beim Erwärmen gelblich, aber es trat keine Trübung mit Abscheidung gelbrother Flocken ein, wie dies schon bei Gegenwart von Spuren von Formaldehyd der Fall ist.

Diese Reaction weist allerdings auch gebundenen Formaldehyd, also die  $\text{CH}_2$ -Gruppe, nach. Aber sie tritt nicht mit allen Methylenverbindungen ein, z. B. nicht mit Methylenzuckersäure und Methylenweinsäure<sup>2)</sup>. Ebenso, wie nun hinzugefügt werden kann, auch nicht mit «Methylenserumalbumin».

Dass diese Bezeichnung berechtigt ist, dürfte aus der Betrachtung der Analysenergebnisse hervorgehen.

### Formaldehyd-Serumalbumin.

#### a) Kurze Einwirkung.

##### Präparat I.

	a)	b)	Mittel
C	51,38 %	51,18 %	51,28 %
H	7,36 %	7,42 %	7,39 %
N	14,26 %	14,10 %	14,18 %

100 N =  
362 C.

##### Präparat II.

C	48,17 %	100 N = 359 C.
H	7,33 %	
N	13,42 %	

#### b) Lange Einwirkung.

##### Präparat III.

	a)	b)	Mittel
C	52,01 %	52,22 %	52,12 %
H	7,33 %	7,38 %	7,36 %
N	14,01 %	13,88 %	13,95 %

100 N = 381 C.

<sup>1)</sup> S. Ber. der deutschen chem. Gesellschaft., Bd. 5, 1872, S. 1094 und Bd. 25, 1892, S. 3213.

<sup>2)</sup> S. Weber und Tollens, Ber. der deutschen chem. Gesellschaft., Bd. 30/III, 1897, S. 2511.

## 2. Einwirkung von Acetaldehyd.

Trägt man Acetaldehyd<sup>1)</sup> in eine Serumalbuminlösung ein, so entsteht zunächst eine Trübung, die aber nicht von einer Fällung herrührt, sondern von der Bildung einer Emulsion. Beim Erwärmen nimmt die Trübung anfangs zu, bald aber erfolgt völlige Klärung. Die Acetaldehyd-Serumalbuminlösung bleibt nach dem Kochen dauernd klar, bei längerem Stehen nimmt sie einen röthlichgelben Stich an.

In den Fällungsreactionen verhält sich die Lösung im Wesentlichen wie die Formaldehyd-Serumalbuminverbindung. Alkohol erzeugt auch hier keine Fällung. Der Alkoholätherniederschlag der aufgekochten Lösung ist noch weniger wasserlöslich, als der Niederschlag der nicht gekochten Lösung.

Erwähnt sei, dass die Acetaldehydverbindung sich beim Neutralisiren etwas anders verhält, als die Formaldehydverbindung. Stumpft man die von der sauren Reaction des Aldehyds her sauer reagirende Lösung mit Soda ab, so tritt, sobald neutrale Reaction erreicht ist, regelmässig ein Niederschlag auf, der im geringsten Ueberschusse von Säure sowohl als von Alkali mit grosser Leichtigkeit in Lösung geht. Für die Analyse wurden die Präparate mit Acetaldehyd genau so dargestellt, wie oben für Formaldehyd angegeben wurde. Nach dem Trocknen im Vacuum waren sie gelbroth gefärbt, im Uebrigen boten sie das Verhalten der Formaldehydverbindung dar.

Die Analyse des bei kurzer Einwirkung erhaltenen Präparates ergab:

### Acetaldehyd-Serumalbumin.

#### Präparat IV.

	a)	b)	Mittel
C	53,46 %	53,38 %	53,42 %
H	7,34 %	7,28 %	7,31 %
N	13,10 %	12,77 %	12,94 %

100 N = 413 C.

<sup>1)</sup> Das Präparat wurde vor der Verwendung überdestillirt.

	a)	b)	Mittel
C	55,63 %	55,35 %	55,49 %
H	7,54 %	7,66 %	7,60 %
N	13,00 %	12,73 %	12,87 %

100 N = 431 C.

### 3. Einwirkung von anderen Aldehyden.

Propionaldehyd verhält sich gegen Serumalbumin fast genau wie Acetaldehyd. Die mit Propionaldehyd gekochte Albuminlösung trübt sich beim Erkalten wieder. Die Reactionen der Lösung und die Lösungsverhältnisse des Alkoholätherniederschlags entsprechen jenen des Acetaldehydproduktes.

Durch Oenanthaldehyd wurde die Gerinnbarkeit des Serumalbumins beim Kochen nicht völlig aufgehoben. Wahrscheinlich coagulirt das Serumalbumin allein, ohne dass mit dem Aldehyd, der nach Massgabe seiner geringeren Löslichkeit weniger reactionsfähig ist, eine Verbindung eingetreten wäre.

Als gänzlich unfähig, die Gerinnung hintanzuhalten, erwiesen sich Isovaler- und Isobutyraldehyd. Sie liefern eine Emulsion, aus der sich beim Erhitzen und auch beim Stehen Häutchen oder Flocken abscheiden.

Anders verhalten sich die aromatischen Aldehyde. Bei Zusatz von Benz- und Salicylaldehyd zur Serumalbuminlösung entsteht eine dichte, milchige Emulsion; beim Erhitzen tritt keine Coagulation ein, die Trübung wird vielmehr geringer. Völlige Aufhellung erfolgt durch Zusatz von Alkohol. Dieser nimmt die überschüssigen suspendirten Aldehydtröpfchen auf. Die alkoholische Lösung ist durch Aether fällbar.

Die Darstellung des zur Analyse bestimmten Präparates erfolgte in der oben für die Form- und Acetaldehydverbindungen angegebenen Weise mit Fällung nach nur einstündigem Stehen. Hier das Ergebniss der Doppelanalyse:

**Benzaldehyd-Serumalbumin** (kurze Einwirkung).

**Präparat VI.**

	a)	b)	Mittel
C	52,36 ‰	52,36 ‰	52,36 ‰
H	6,82 ‰	6,94 ‰	6,88 ‰
N	—	14,27 ‰	14,27 ‰

100 N = 367 C.

**4. Einfluss des Salzgehaltes auf die Bildung der Aldehydeiweissverbindungen.**

In der geschilderten Weise liegen die Verhältnisse bei der Vereinigung der Aldehyde mit ausdialysirtem, also salzfreiem oder wenigstens sehr salzarmem Serumalbumin. Bringt man hingegen eine Lösung von Serumalbuminkristallen, ohne sie durch Dialyse vom Ammoniumsulfat befreit zu haben, mit den verschiedenen Aldehyden zusammen, so ergeben sich vielfach andere Fällungserscheinungen. Durch den Salzgehalt wird, wie auch sonst zumeist, die Fällung begünstigt.

Schon für den Formaldehyd ist eine Differenz erweislich. Während die salzfreie Verbindung, wie betont, auch durch absoluten Alkohol nicht fällbar ist, wird die salzhaltige Verbindung bereits durch 96%igen Alkohol gefällt. Ebenso bewirkt Aceton flockige Fällung.

Noch deutlicher sind die Unterschiede, die der Salzgehalt der Lösung bewirkt, bei den anderen Aldehyden. In ammoniumsulfathaltiger Serumalbuminlösung erzeugt ein grosser Ueberschuss von Acetaldehyd oder von Propionaldehyd Trübung, die anfangs noch beim Umschütteln verschwindet, bei weiterem Aldehydzusatz aber bestehen bleibt; schliesslich fallen Flocken aus, die sich beim Erwärmen zusammenballen.

Benzaldehyd und Salicylaldehyd aber erzeugen sofort, schon bei Zusatz weniger Tropfen zur salzhaltigen Albuminlösung, Fällung.

**B. Versuche mit Eialbumin, Serumglobulin, Edestin, Heteroalbumose, jodirtem Eialbumin.**

**1. Eialbumin.**

Die Coagulirbarkeit einer Lösung von krystallisirtem Eialbumin wird durch die Aldehyde nur dann aufgehoben, wenn die Lösung salzfrei ist. Bei starkem Salzgehalt erfolgt auch durch Formaldehyd schon in der Kälte Fällung.

Ebenso gilt für das Eierklar die Aufhebung der Gerinnbarkeit beim Kochen durch Formaldehyd nur für verdünnte

gearbeitet. Eierklar direkt mit Formaldehyd behandelt gibt zunächst ein gelatinöses Produkt, das beim Erkalten nicht gerinnt. Bei weiterem Zusatz entsteht schon in der Kälte Trübung, durch einen grossen Ueberschuss von Formaldehyd bildet sich eine starre Gallerte.

So besteht also die älteste Angabe über die Wirkung von Formaldehyd auf Eiweiss von Trillat<sup>1)</sup> zu Recht und der Widerspruch mit den späteren Beobachtungen ist nur ein scheinbarer. Sie lautet: *L'aldéhyde formique coagule l'albumine, avec laquelle elle donne une masse transparente et d'aspect gélatineux.*

## 2. Serumglobulin.

Wenn man eine Serumglobulinlösung möglichst lange ausdialysirt, bis nur noch so viel Ammonsulfat vorhanden, als zur Lösung des Globulins nothwendig ist, so zeigt sie Aldehyden gegenüber das nämliche Verhalten, wie die salzfreie Serumalbuminlösung. Nur nehmen die Lösungen bei längerem Stehen milchige Opalescenz an.

Die salzhaltige Globulinlösung gibt mit geringen Mengen von Formaldehyd eine klare, hitzebeständige Lösung, aus der später kleine Flocken ausfallen. Beim Zusatz eines Ueberschusses von Formaldehyd nimmt die vorher klare Lösung Opalescenz an, die rasch zunimmt. Innerhalb weniger Minuten bildet sich eine dicke Gallerte, so dass man die Eprouvette umstülpen kann. Acet- und Propionaldehyd erzeugen sofort flockigen Niederschlag, Benz- und Salicylaldehyd voluminöse Fällung.

Versetzt man Blutserum (vom Pferde) direkt mit Formaldehyd, so erhält man eine klare Lösung, die beim Kochen nicht gerinnt. Nach 24stündigem Stehen tritt jedoch starke Trübung ein, und nach einigen Tagen bildet sich, wie bereits Benedicenti (l. c.) beobachtet hat, eine compacte Gelatine. Acet- und Propionaldehyd erzeugen schon in der Kälte massige Fällung und die ganze Masse wird sofort starr gallertig.

<sup>1)</sup> Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. Bd. 114. 1892, S. 1278.

### 3. Edestin.

Das schön krystallisirte Präparat<sup>1)</sup> wurde unter Zusatz von etwas Soda gelöst und blieb mit neutral reagirendem Formaldehyd drei Tage lang stehen.<sup>2)</sup> Dann wurde mit Salzsäure gefällt, der Niederschlag mit Wasser und mit Alkoholäther chlor- und aldehydfrei gewaschen und lufttrocken analysirt.

Die Doppelbestimmung des Präparats ergab folgende Werthe:

#### Formaldehyd-Edestin.

##### Präparat VII.

	a)	b)	Mittel	
C	48,27 %	47,84 %	48,06 %	100 N = 291 C.
H	7,33 %	7,44 %	7,39 %	
N	16,50 %	16,52 %	16,51 %	

### 4. Heteroalbumose des Fibrins.

Das mir von Herrn Dr. Pick freundlichst zur Verfügung gestellte Präparat von Heteroalbumose wurde in warmem Wasser gelöst, warm filtrirt und sofort mit Formaldehyd versetzt. Am nächsten Tage wurde mit Alkoholäther gefällt und der weisse flockige Niederschlag, nachdem er aldehydfrei gewaschen, lufttrocken analysirt.

Hier sei noch erwähnt, dass auch die Heteroalbumose gleich nach dem Zusatz von Formaldehyd ihre Fällbarkeit einbüsst. Beim Stehen erfolgt allerdings Trübung, die nach mehreren Tagen in Coagulation übergeht.

Die Analyse ergab Folgendes:

#### Formaldehyd-Heteroalbumose.

##### Präparat VIII.

C	48,86 %	100 N = 356 C.
H	7,49 %	
N	13,71 %	

<sup>1)</sup> Präparat der Höchster Werke.

<sup>2)</sup> In einer stark salzhaltigen Edestinlösung entsteht bei Formaldehydzusatz ein Niederschlag.



Von Interesse für die Deutung der Aldehydanlagerung schien die Beantwortung der Frage, ob Formaldehyd noch in ein Eiweissmolekül eintritt, das bereits eine andere Verbindung eingegangen ist. Dazu wurde ein von Herrn Professor Hofmeister aus krystallisirtem Eieralbumin dargestelltes Präparat von Jodalbumin benützt.

Das Präparat wurde unter Zusatz von wenig Soda in Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit einer neutralen Formaldehydlösung versetzt und so eine Woche stehen gelassen. Alkohol, Aether, Ligroin erzeugen keine Fällung, wohl aber Salzsäure. Der salzsaure Niederschlag wurde zur Entfernung der Salzsäure und des Formaldehyds mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und lufttrocken analysirt.

Die Doppelanalyse des so mit Formaldehyd behandelten Jodalbumins lieferte folgende Werthe:

Präparat IX.

	a)	b)	Mittel
C	44,83 %	44,56 %	44,70 %
H	6,77 %	6,73 %	6,75 %
N	13,19 %	13,38 %	13,29 %

100 N = 337 C.

## II. Chemischer Vorgang bei der Aldehydanlagerung.

Bei dem complicirten Bau der Eiweissstoffe und unserer unzureichenden Kenntniss desselben können Vorstellungen über die Art der im Vorliegenden beschriebenen Reaction nur auf Wahrscheinlichkeit Anspruch erheben. Blum hat (l. c.) die Vermuthung ausgesprochen, dass der Formaldehyd, sei es mit Amingruppen, sei es mit Hydroxylgruppen, unter Wasseraustritt in Reaction tritt, so dass Methylenverbindungen der Albumine resultirten.

Hiermit ist jedoch die Zahl der gegebenen Möglichkeiten bei Weitem nicht erschöpft, da der Stickstoff im Eiweiss nur zum Theil in Aminform, vermuthlich überwiegend als Imin-

rest und in tertiär gebundener Form<sup>1)</sup> vorhanden ist, und da überdies bei hippursäureartiger Bindung  $-\text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}-$  die Anlagerung des Aldehyds auch an ein dem N benachbartes C-Atom (der  $\text{CH}_2$ -Gruppe) erfolgen kann.

Ferner ist zu beachten, dass eine einzige  $\text{NH}_2$ -Gruppe zur Anlagerung von zwei, vielleicht von noch mehr Aldehydresten Veranlassung geben kann.<sup>2)</sup> Auch die SH-Gruppe des Eiweisses könnte eine besondere Rolle spielen.

Da die Spaltung der Eiweisskörper vorwiegend Aminosäuren der Fettreihe liefert, wird man immerhin in erster Reihe an Verbindungen etwa analog dem von H. Schiff<sup>3)</sup> dargestellten Monomethylenasparagin denken, in zweiter Reihe, so weit es sich um Eiweisskörper mit einer Kohlenhydratgruppe handelt, an Produkte, wie sie Tollens<sup>4)</sup> und seine Schüler bei der Einwirkung von Formaldehyd auf mehrwerthige Alkohole und Säuren der Zuckergruppe erhalten haben. Auch in diesen Fällen reagirt der Formaldehyd derart, dass sein Sauerstoff mit 2 H der beigemengten Körper  $\text{H}_2\text{O}$  bildet und Methylen,  $\text{CH}_2$ , statt des Wasserstoffes eintritt.

Zur Beurtheilung dieser Möglichkeiten ist zunächst erforderlich, ein Urtheil darüber zu gewinnen, wie viel Aldehydgruppen in das Eiweissmolekül eintreten und in wie weit daher sonstige chemische Umwandlungen im Eiweiss sich vollziehen. Darüber geben die Elementaranalysen Aufschluss.

Da die Produkte, wie oben erwähnt, wegen ihrer Zersetzlichkeit nicht bis zur Gewichtsconstanz getrocknet wurden, sondern lufttrocken analysirt sind, so ist auf den absoluten Gehalt an den einzelnen Elementarbestandtheilen kein Gewicht zu legen; denn dieser ist natürlich durch den wechselnden Wassergehalt stark beeinflusst. So musste auch darauf verzichtet werden, Molekularformeln aufzustellen. Aber, worauf es bei der Beurtheilung, ob und wie viel Aldehydgruppen in

---

1) S. Paal, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 29, 1896, S. 1086.

2) S. Erlenmeyer jun., Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 30, 1897, S. 2896.

3) Chemiker-Zeitung, Bd. 23, 1899, S. 20.

4) S. Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 27/II, 1894, S. 1892 und Bd. 30/III, 1897, S. 2510.

Verhältniss zwischen Stickstoff und Kohlenstoff. Es wurde also für jedes Präparat berechnet, wie viel Atome C auf 100 Atome N entfallen.

Da eine Abspaltung von Stickstoff durch die Aldehyd- einwirkung nicht erfolgt; so kann der Stickstoffgehalt der verwendeten reinen Eiweisskörper zur Grundlage der weiteren Berechnung gemacht werden. Die Veränderungen, die das Verhältniss von N- und C-Atomen durch die Aldehydanlagerung erfährt, ist aus nachstehender Tabelle ersichtlich:

Präp.	Ver- wendeter Eiweiss- körper	darin N : C	Ver- wendeter Aldehyd	Dauer der Ein- wirkung	im Produkt N : C	Zu- nahme der C- Atome auf 100 N	Zahl der ein- getretenen Aldehyd- moleküle auf 100 N
I.	Serumalbumin	100 : 338 <sup>1)</sup>	Formaldehyd	sehr kurz	100 : 362	24	24
II.	"	"	"	"	100 : 359	21	21
III.	"	"	"	2 Monate	100 : 381	43	43
IV.	"	"	Acetaldehyd	kurz	100 : 413	75	37,5
V.	"	"	"	2 Monate	100 : 431	93	46,5
VI.	"	"	Benzaldehyd	1 Stunde	100 : 367	29	4
VII.	Edestin	100 : 272 <sup>2)</sup>	Formaldehyd	3 Tage	100 : 291	19	19
VIII.	Heteroalbumose	100 : 307 <sup>3)</sup>	"	1 Tag	100 : 356	49	49
IX.	jodirt. Ovalbumin	100 : 336 <sup>4)</sup>	"	7 Tage	100 : 337	1	1

Bei Durchsicht dieser Tabelle ergeben sich merkliche Verschiedenheiten je nach der Art des verwendeten Eiweisskörpers und Aldehyds. Benzaldehyd reagirt ungleich träger auf Serumalbumin als Acet- und Formaldehyd. Heteroalbumose nimmt unter gleichen Umständen mehr, Edestin weniger Formaldehyd auf, das jodirte Ovalbumin gar keines; denn das gefundene Plus von 1C entspricht einer Er-

<sup>1)</sup> Berechnet nach Michel-Gürber, Serumalbuminkristalle, Würzburg (Stahel), 1895 (C = 53,04, N = 15,71).

<sup>2)</sup> Berechn. nach Ritthausen und Osborne im Mittel (C = 51,13, N = 18,78) (s. Ref. Jahresb. f. Thierchemie Bd. 12 und 23).

<sup>3)</sup> Berechnet nach Ernst P. Pick, diese Zeitschr., Bd. XXVIII, 1899, S. 219.

<sup>4)</sup> Berechnet nach Hofmeister, diese Zeitschr., Bd. XXIV, 1898, S. 159.

höhung des C-Procentgehaltes um nicht ganz 0,2%, fällt also innerhalb der Fehlergrenzen der Analyse.

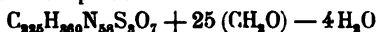
Zieht man nun die nach der Darstellung vergleichbaren Präparate in Betracht (Serumalbumin und die beiden einfachsten Aldehyde), so ergibt sich:

1. dass die Zahl der eintretenden Aldehydgruppen mit der Dauer der Einwirkung steigt,

2. dass bei sehr langer, maximaler Einwirkung die Zahl der eingetretenen Aldehydgruppen bei beiden Aldehyden nahezu gleich ist (43 bzw. 46,5 Moleküle auf 100 N-Atome).

Nach den oben entwickelten Vorstellungen dürfte die Anlagerung von Aldehyd mit Abspaltung einer gleichen Anzahl von Wassermolekülen verknüpft sein. Da aber die Präparate wegen Gefahr der Zersetzung nur bei Zimmertemperatur getrocknet werden konnten, bringen die Analysen nur einen kleinen Theil dieses Wasserverlustes zum Ausdruck. Sie zeigen aber doch, dass eine anderweitige Veränderung im Eiweissmolekül nicht Platz gegriffen hat.

So berechnet sich unter Benützung der von Kurajeff<sup>1)</sup> gegebenen Formel des Serumalbumins für das durch langdauernde Formaldehyd-einwirkung erhaltene Präparat III nach



der Gehalt an

$$C = 52,03, H = 6,97, N = 14,08\%,$$

während im Mittel gefunden wurde:

$$C = 52,12, H = 7,36, N = 13,95\%.$$

In Wirklichkeit dürfte der Wasserverlust ein viel grösserer sein, als diese Gleichung besagt.

Was den Ort der Anlagerung der Aldehydreste anlangt, so geht aus den gefundenen Zahlenverhältnissen hervor, dass die Anzahl der vorhandenen N-Atome, wenn sie in Form von Amin- resp. Imingruppen vorhanden sind, für die Bindung der Aldehydreste mehr als ausreicht.

Damit ist freilich nicht ausgeschlossen, dass auch Hydroxylgruppen, etwa jene des Kohlenhydratcomplexes, an der Bindung theilgenommen sind. So kann man wenigstens den oben erwähnten

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXVI, 1899, S. 462.

ist jedoch nicht zwingend. Denn die Anwesenheit freien Formaldehyds im Reaktionsgemenge stört diese Farbenreactionen. Formaldehyd mit  $\alpha$ -Naphthol und concentrirter Schwefelsäure allein liefert einen braunrothen Farbenton, der das Violett der Molisch'schen Reaction beeinträchtigt. Zwar fällt auch an einem von überschüssigem Formaldehyd befreiten Präparat die Reaction negativ aus. Doch ist auch da die Möglichkeit einer Beeinflussung durch Formaldehyd nicht ausgeschlossen, weil durch die Einwirkung der Schwefelsäure Formaldehyd aus dem Präparate abgespalten werden dürfte.

Beachtenswerth ist auch die Unfähigkeit des jodirten Eialbumins, Aldehyd zu addiren. Man könnte daran denken, dass hier diejenigen Gruppen, welche zur Aufnahme des Aldehyds geeignet sind, durch Jod besetzt sind. Wie irrig eine solche Vorstellung wäre, ergibt sich sofort, wenn man überlegt, dass nach Kurajeff Serumalbumin auf 58 N bloss  $5\frac{1}{2}$  Jodatome, nach meiner Analyse aber 24 Formaldehydmoleküle, also die mehr als vierfache Zahl, aufzunehmen vermag. Dass die Jodirung des Eiweisses diesem die Fähigkeit raubt, mit Aldehyd zu reagiren, muss sonach einen anderen Grund haben.

Alles erwogen, darf man die erhaltenen Produkte wohl als Methylen-, Aethylen-, Benzylidenderivate des sonst unveränderten Eiweissmoleküls ansehen.

### **III. Verhalten des Methylen- und Aethylenserumalbumins gegen verdauende Fermente.**

Ueber den Einfluss von Formaldehyd auf die Verdauung von Eiweisskörpern liegen einige Angaben in der Litteratur vor, die nicht ganz mit einander übereinstimmen. Nach Benedicenti (l. c.) sollen, wie schon Eingangs erwähnt, die Formaldehydverbindungen aller von ihm untersuchten Eiweisskörper weder durch Pepsin, noch durch Trypsin verdaut werden. Die anderen Beobachter haben sich nur mit der Pepsinverdauung beschäftigt. Sie finden nur eine Verzögerung

durch Formaldehyd, so Weigle und Merkel<sup>1)</sup> für Hühner-eiweiss und für die Milch, Mabery und Goldsmith<sup>2)</sup> für Fibrin, und Lepierre<sup>3)</sup> für verschiedene, von ihm dargestellte Eiweiss-Formaldehydverbindungen.

Zunächst wurde in einem Versuche (Versuch 1) die Einwirkung von Pepsin und Trypsin auf eine mit Formaldehyd versetzte Serumalbuminlösung untersucht.

Als Beweis für stattgehabte Verdauung diente die Biuret-reaction in der völlig enteiuweissten Verdauungslösung. Zur Abscheidung des Eiweisses wurde das Verfahren von Hofmeister: Kochen mit Eisenchlorid und Natriumacetat nach genauer Neutralisation mit Natronlauge, benützt.

Dabei ergab sich, dass Trypsin bei Anwesenheit von überschüssigem Formaldehyd überhaupt nicht zur Wirkung kam. Die Pepsinverdauung war zwar gehemmt, doch nicht ganz aufgehoben.

Um den Einfluss freien Formaldehyds auszuschalten, wurde hierauf ein formaldehydfreies Präparat (Nr. III) der Verdauung unterzogen.

#### Versuch 2.

- a) Methylenserumalbumin in Wasser + Pepsin-Salzsäure,
- b) „ „ „ + Trypsin-Soda,
- c) und d) Kontrollprobe mit je einer Fibrinflocke.

Da das Präparat in Wasser unlöslich ist, konnte die Biuretreaction in der Verdauungsflüssigkeit direkt angestellt werden. Nach vier Stunden: Fibrinflocken in c) und d) zum Theil aufgelöst, Biuretreaction stark positiv, aber auch bei a) ganz deutlich. Bei b) auch nach 20 Stunden keine Spur von Biuretfärbung.

Der hier ersichtliche Unterschied zwischen der tryptischen und der peptischen Angreifbarkeit des Methylenserumalbumins lässt sich weiter noch auf folgende Weise darthun: Unterwirft man den unverdauten Rückstand des Trypsinversuches (2b) der Einwirkung von Pepsin-Salzsäure, so tritt nach wenigen Stunden in der Verdauungsflüssigkeit Biuretreaction auf.

---

1) Ref. Jahresber. f. Thierchemie für 1895, Bd. 25, S. 228.

2) Ref. Chem. Centralbl. 1898/I, S. 69.

3) Compt. rend. Acad. Sc. Bd. 128, 1899/I, S. 739.

Der analoge Versuchsanordnung, wie in Versuch 2, ergab sich für ein Präparat von Aethylenserumalbumin (Nr. V) in der Pepsinprobe deutliche, in der Trypsinprobe eine Spur Biuretreaction.

Das methylenisirte Eiweiss ist also tryptisch gar nicht, das äthylenisirte Eiweiss fast gar nicht angegriffen worden; Pepsin aber war in beiden Fällen wirksam.

In Versuch 2 a) und b) und 3 a) und b) liess sich am Schlusse der Versuchszeit in den Verdauungsflüssigkeiten eine Spur freien Aldehyds nachweisen, der bei der Digestion bei 40° C. aus den Präparaten abgespalten worden war. Es war also noch die Möglichkeit nicht auszuschliessen, dass die Trypsinwirkung durch diese Spuren freien Aldehyds beeinträchtigt worden sein konnte.

Deshalb wurden die Trypsinverdauungsflüssigkeiten beider Versuche mit Fibrinflocken beschickt und neuerlich 12 Stunden im Wärmeschrank belassen. Die Flocken wurden verdaut, wenn auch schwächer, als durch frisches Trypsin. Die Spuren Aldehyd reichten also nicht hin, um die fermentative Wirksamkeit des Trypsins überhaupt zu unterdrücken.

Um über die Bedeutung grösserer Aldehydmengen für die beiden Fermentwirkungen ein Urtheil zu gewinnen, wurde folgende Versuchsserie angestellt, zu der als leicht verdaubares Eiweiss Fibrin herangezogen wurde.

#### Versuch 4. Versuchsdauer 9 Stunden.

I. Pepsin-Salzsäure	Biuret-reaction	II. Trypsin-Soda	Biuret-reaction
a) Fibrin allein	positiv	a) }	positiv
b) Fibrin + Formaldehyd	positiv	b) }	negativ
c) > + Acetaldehyd	positiv	c) }	negativ
d) Methylenserumalbumin (Präparat IV.)	positiv	d) }	negativ

Pepsin erwies sich also in allen Proben als wirksam. Es waren nur zeitliche Differenzen zu constatiren. Probe I a), I c) und I d) zeigten schon nach 4 Stunden Biuretreaction, I b) erst nach 9 Stunden. Durch Acetaldehyd wurde also der

zeitliche Ablauf der Pepsinverdauung des Fibrins nicht gehemmt, sondern nur durch Formaldehyd. Hingegen beeinträchtigt nicht nur Formaldehyd, sondern auch Acetaldehyd die Trypsinverdauung des Fibrins. Nach 9 Stunden war die Biuretprobe bei II b) und c) negativ, erst nach 24 Stunden zeigte sich bei c) eine Spur Biuretreaction.

Die Thatsache, dass auch die aldehydfreien Präparate von Trypsin nicht angegriffen werden, lässt für die Fibrinversuche noch die Deutung zu, dass durch die Aldehyde nicht eigentlich das Trypsin direkt in seiner Wirksamkeit gehemmt wird, sondern dass sich während des Versuches eine Aldehydfibrinverbindung bildet, die dann gegen Trypsin resistent ist.

Um diesem Einwande zu begegnen, wurde in einem anschliessenden Versuche die Fibrinflocke, nicht wie früher, direkt in Wasser, dem einige Tropfen Formaldehyd zugesetzt waren, eingebracht, sondern in einer Atmosphäre von Formaldehyddämpfen der Trypsinwirkung ausgesetzt.

Auch bei dieser Versuchsanordnung, bei der die Entstehung einer Fibrin-formaldehydverbindung recht unwahrscheinlich ist, erwies sich das Trypsin als unwirksam.

Uebrigens steht dieser Befund, dass die beiden Aldehyde die Trypsineinwirkung hemmen oder aufheben, die peptische Verdauung aber kaum beeinflussen, in bestem Einklange mit Beobachtungen, die in einer erst nach Abschluss meiner Versuche erschienenen Arbeit von Bliss und Novy<sup>1)</sup> mitgeteilt sind. Diese Autoren haben bei einer systematischen Untersuchung des Einflusses von Formaldehyd auf Enzyme gefunden, dass Trypsin durch Formaldehyd leicht zerstört wird, Pepsin aber bis zu 5% Formaldehyd wochenlang verträgt.

Die Schlussfolgerungen, die sich aus den mitgetheilten Verdauungsversuchen ableiten lassen, sind etwa folgende:

Die Trypsinverdauung wird durch Formaldehyd gehemmt oder aufgehoben, durch Acetaldehyd beeinträchtigt. Die Unangreifbarkeit der Aldehydeiweissverbindungen für Trypsin hängt aber nicht von diesem Umstande ab, da die Spuren

---

1) Ref. Centralbl. f. Physiol., Bd. 13, 1899, S. 144.



Aldehyd, die bei der Verdauung von solchen Verbindungen nach und nach frei werden, nicht zur totalen Aufhebung der Trypsinwirkung genügen.

Vielmehr scheint durch die Methylenisirung bezw. Aethylenisirung der Angriffspunkt für das Trypsin besetzt zu sein, sodass es nicht mehr einwirken kann. Aus der Thatsache, dass die Pepsinverdauung erhalten bleibt, lässt sich vermuthen, dass entweder der Angriff des Eiweissmoleküls durch Pepsin an anderer Stelle erfolgt als durch Trypsin, oder dass bei der Pepsinverdauung die Salzsäure die besetzten Stellen durch Aldehydabspaltung frei macht.

Fasst man ins Auge, dass die Spaltung der Eiweisskörper im Ganzen und Grossen durch Pepsin und Trypsin in gleichem Sinne erfolgt, insbesondere aber, dass die Versuche von Kurajeff (l. c.) und von Dr. F. Baum<sup>1)</sup> im hiesigen Institute sehr wahrscheinlich gemacht haben, dass im ersten Beginn der Spaltung, bei der Bildung der primären Albumosen, nur Verschiedenheiten in Betreff des zeitlichen Verlaufes, nicht aber der gebildeten Produkte bestehen, so wird man der zuletzt angeführten Vorstellung den Vorzug geben.

---

<sup>1)</sup> Noch nicht publicirte Versuche.

# Beiträge zur Kenntniss der elementaren Zusammensetzung und Verbrennungswärme der Muskelsubstanz verschiedener Thiere.

Von  
Dr. A. Köhler.

(Aus der Königl. landwirthschaftlichen Versuchsstation zu Mückern.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Dezember 1900.)

Mit der Ermittlung der elementaren Zusammensetzung und des Wärmewerthes des Muskelfleisches unserer Nutzthiere haben sich trotz der Wichtigkeit des Gegenstandes für die Ernährungsphysiologie bis jetzt wenige Forscher befasst. E. Pflüger<sup>1)</sup> konnte noch im Jahre 1892 in einer kritischen Besprechung über Ernährungsversuche, welche von Pettenkofer und Voit ausgeführt worden sind, unter Kapitel «Fleisch» bemerken: «Bei dem heutigen Standpunkt der Wissenschaft sind wir auf zwei Analysen angewiesen, von denen die eine von Rubner,<sup>2)</sup> die andere von Stohmann und Langbein<sup>3)</sup> ausgeführt wurde: Die Zusammensetzung des entfetteten trockenen Ochsenfleisches ist hiernach»:

Stohmann und Langbein:	Rubner:	
Kohlenstoff . . . . .	49,25	50,46
Wasserstoff . . . . .	6,91	7,6
Stickstoff . . . . .	15,49	15,4
Sauerstoff und Schwefel . .	23,03	20,97
Asche . . . . .	5,32	5,5
	<hr/>	<hr/>
	100,00	99,93

1) Pflüger's Arch. 1892, Bd. 52, 247.

2) Zeitschr. f. Biol. 1885, Bd. 21, 312.

3) Journ. f. prakt. Chem. 1891. N. F., Bd. 44, 364.

sammensetzung des Ochsenfleisches stellten 1894 P. Argutinsky<sup>1)</sup> und später Berthelot<sup>2)</sup> an. Argutinsky fand folgende Mittelzahlen für das entfettete Ochsenfleisch:

Kohlenstoff . . . . .	49,6
Stickstoff . . . . .	15,3
Wasserstoff . . . . .	6,9
Sauerstoff und Schwefel . . .	23,0
Asche . . . . .	5,2
	<hr/>
	100,00

Trotzdem ist die Kenntniss über die elementare Zusammensetzung des Fleisches noch nicht sicher gestellt, zumal Untersuchungen von C. Dormeyer<sup>3)</sup> mit Sicherheit den Beweis erbrachten, dass gepulvertes Muskelfleisch mit Hülfe der einfachen Aetherextractionsmethode nach Soxhlet nicht fettfrei zu bekommen ist. Aus den bisher in Betracht kommenden Untersuchungen über die Zusammensetzung des Fleisches geht hervor, dass mit Aether längere oder kürzere Zeit extrahirte Fleischpulver — also keine fettfreien — zur Analyse benutzt worden sind. Dormeyer<sup>4)</sup> ermittelte nachträglich in den von Argutinsky benutzten Fleischpulvern noch einen erheblichen Fettgehalt. Derselbe stellte ferner mit Hülfe der von ihm erprobten Verdauungsmethode fest, dass ein Fleischpulver, welches monatelang mit Aether extrahirt und dazwischen verschiedene Male im Mörser pulverisirt worden war, im Durchschnitt noch 0,75 % Fett enthielt.<sup>5)</sup> Drei weitere von demselben Forscher in ähnlicher Weise mit Aether behandelte Fleischproben einer späteren Untersuchung enthielten noch 0,88 %, 0,81 %, 0,84 % Fett.<sup>6)</sup>

Die bestehende Unsicherheit über die elementare Zusammensetzung des Fleisches war Veranlassung, Untersuchungen

1) Pflüger's Arch. 1894, Bd. 55, 345.

2) M. Berthelot, *Chaleur Animale. Principes chim. de la Production de la chaleur chez les êtres vivants.* Paris, Masson et Cie.

3) Pflüger's Arch. 1895, Bd. 61, 341, und ebend. 1897, Bd. 65, 90.

4) Ebend. 1900, Bd. 79, 567.

5) Ebend. 1895, Bd. 61, 342.

6) Ebend. 1897, Bd. 65, 97.

von Fleisch verschiedener Thiere zur Gewinnung möglichst einwandsfreier Fleischanalysen vorzunehmen, und wurde dazu Fleisch vom Rind, Kaninchen, Hammel, Pferd, Schwein und Huhn benutzt.

Die Dormeyer'schen Angaben bezüglich der Entfettung des Fleischpulvers mittelst der Aetherextractionsmethode galt es zunächst zu prüfen. Bei Bestätigung seiner Versuchsergebnisse ergab sich für mich die Nothwendigkeit, das durch Aether aus den Fleischpulvern nicht extrahirbare Fett mit Hülfe der Dormeyer'schen Verdauungsmethode zu bestimmen und dieses bei der Berechnung auf C, H, N, S und Wärmewerth zu berücksichtigen.

Im Folgenden gebe ich das Wesentlichste über Zubereitung und Trocknen des frischen Fleisches, Entfetten und Zerkleinern desselben in getrocknetem Zustande wieder.

Die Fleischproben wurden in einer grösseren Schlächterei unmittelbar nach Schlachtung der betreffenden Thiere genommen und ohne grossen Zeitverlust in gut schliessenden Glasbüchsen nach dem Laboratorium gebracht, wo das Fleisch, nachdem es möglichst schnell von den sichtbar anhaftenden Fett- und Sehnen theilen befreit worden war, mit einem scharfen Hackmesser auf einem glatt gehobelten Hackbrett aus Eichenholz zu einem feinen Brei zerkleinert wurde. Während nun Argutinsky diesen Fleischbrei in evacuirten Exsiccatoren über Schwefelsäure ohne Zersetzungserscheinungen trocknete, musste ich von diesem Verfahren absehen, weil mir verschiedene nach der Argutinsky'schen Weise zum Trocknen angesetzte Fleischproben verdarben. Die Exsiccatoren konnten mit Hülfe unserer Saug- und Wasserstrahlpumpen nicht genügend evacuirt werden. Unter diesen Umständen musste zum Trocknen des Fleischbreies durch Erhitzen desselben geschritten werden. Hohe Temperaturen waren dabei zu vermeiden, um durch zu grosse Wärme Zersetzungserscheinungen möglichst zu verhindern.

In dem Soxhlet'schen Trockenschranke<sup>1)</sup> bot sich mir

---

1) Zeitschr. f. angew. Chem. 1891, S. 363.

nissmässig niedriger Temperatur schnell zu trocknen. Bekanntlich zeichnet sich dieser Trockenschrank durch eine hohe Ventilation aus. Indem beständig ein warmer Luftstrom über die zu trocknende Substanz, welche in flachen Glasschalen möglichst dünn ausgebreitet liegt, hinwegstreicht, ist dieser Trockenapparat nach den Angaben des Erfinders in der Schnelligkeit der Trocknung jedem Vacuumtrockenapparate überlegen. Ich stellte den Trockenschrank auf  $55^{\circ}$  C. ein und trocknete bei dieser Temperatur sämtliche Fleischproben. In der Regel wurden von einer Fleischprobe gleichzeitig vier Portionen zu je 30 bis 40 g in flachen Glasschalen angesetzt, so dass mit wenig Ausnahmen durchschnittlich für eine Analysirprobe 120—160 g frischen Fleisches in Anwendung kamen. Nach 2 bis 3 Stunden war der Fleischbrei an der Oberfläche trocken und zu einem dunkelrothen, bisweilen auch braun gefärbten Kuchen zusammengebacken. Letzterer wurde hierauf gewendet, um die unteren noch feuchten Stellen desselben dem warmen Luftströme auszusetzen. Nach 6 bis 8 Stunden waren die Fleischmassen trocken, d. h. von der Hauptmenge Wasser befreit.

Das Trocknen der Proben bis zum constanten Gewichte erfolgte in evacuirten Exsiccatoren über Schwefelsäure, wobei nach 8—14 Tagen eine Gewichtsabnahme nicht mehr stattfand. Auf diese Weise wurde die Trockensubstanz des frischen Fleisches festgestellt mit der Gewissheit, dass störende Zersetzungen überhaupt vermieden worden waren.

Für die Entfettung wurde das trockene Fleisch zunächst nur grob zerkleinert. Begierig saugt es hierbei Wasser auf und wurde deshalb vor der Behandlung mit Aether in Extractionspatronen im evacuirten Exsiccator bis zum constanten Gewichte getrocknet. Sobald dieses erreicht war, wurde ein mit Hebevorrichtung versehener Soxhlet'scher Extractionsapparat, bei dem sämtliche Theile, Glas auf Glas, eingeschliffen waren, bereit gehalten, der Exsiccator schnell geöffnet und die mit Fleischpulver gefüllte Patrone sofort in den Extractionsapparat eingeführt. Um ein Eindringen von

Wasserdämpfen in den Apparat zu verhindern, war dem Kühler ein mit Chlorcalcium gefülltes Rohr aufgesetzt worden. Der zur Extraction benutzte Aether wurde über Kalk und dann über Natrium getrocknet. Durch die Untersuchungen Dormeyer's veranlasst, extrahirte ich das Fleischpulver ohne Unterbrechung 96 Stunden (I. Extraction). Hierbei wurde der Fleischsubstanz die Hauptmenge an Fett entzogen und letzteres als Rohfett bestimmt. Das so entfettete Fleischpulver wurde im Mörser fein zerrieben und durch ein 0,5 mm-Sieb abgeseiht. Die im Sieb in geringen Mengen zurückbleibenden faserigen Reste wurden mit der Scheere fein zerkleinert und dem übrigen Fleischpulver wieder zugefügt. Dasselbe wurde wieder in die Soxhlet'sche Extractionspatrone gebracht, bis zum constanten Gewichte getrocknet und abermals 96 Stunden mit wasserfreiem Aether extrahirt (II. Extraction).

Der zweiten Extraction folgten eine III., IV. und V., wobei jedesmal die Muskelsubstanz vorher im Mörser zerrieben wurde. Die Hauptmenge Fett wurde, wie schon oben gesagt, dem Fleisch bei der ersten Extraction entzogen, doch wurden selbst bei der V. Extraction noch geringe Fettmengen erhalten, deren Gewicht aus folgenden Beispielen zu ersehen ist:

Ochsenfleisch				Kaninchenfleisch	
	Zeit- dauer	Angew. Tr. S. g	Fett g	Angew. Tr. S. g	Fett g
I. Extraction	96 St.	12,7645	0,4610	19,5115	0,3926
II.     "	"		0,0170		0,0124
III.    "	"		0,0092		0,0108
IV.     "	"		0,0040		0,0050
V.      "	"		0,0032		0,0064
Summa . .	480 St.				

Da die Fettmengen bei den Extraktionen der übrigen Fleischproben in ähnlicher Weise abnehmen und nach einer 480stündigen Extractionsdauer nicht verschwinden, so durfte ich diese Thatsachen als Bestätigung der Dormeyer'schen

Muskelsubstanzen auffassen.

Getrocknetes und fein zerkleinertes Muskelfleisch ist mittelst der Aetherextractionsmethode selbst nach wochen- und monatelangem Extrahiren nicht fettfrei zu erhalten.

Das Entfetten der Fleischproben wurde deswegen nach der V. Aetherextraction als zeitraubend und nicht zum Ziele führend eingestellt. Das Fett, welches dann noch in den Fleischpulvern enthalten war, wurde mittelst der Dormeyer'schen Verdauungsmethode<sup>1)</sup> bestimmt und später für C, H, N, S und Wärmewerth in Anrechnung gebracht.

Die Fleischproben wurden in den sich anschliessenden Untersuchungen nicht im getrockneten (Trockensubstanz), sondern im lufttrockenen Zustande benutzt, nachdem ich mich, durch die Angaben von Argutinsky<sup>3)</sup> veranlasst, von der hochgradigen hygroskopischen Eigenschaft der getrockneten und fein zerriebenen Muskelpulver überzeugt hatte. Beim Abwägen, Pressen der Fleischsubstanz zu Blöcken für die calorimetrischen Untersuchungen z. B. müssen unter allen Umständen bei Anwendung der Fleisch Trockensubstanz in das Gewicht fallende Fehler eintreten, weil hierbei eine längere Berührung der trockenen Substanz mit der wasserhaltigen Luft nicht zu vermeiden ist. Ich liess deshalb durch 2—3tägiges Stehen der trockenen Fleischpulver in offenen Glasbüchsen dieselben sich mit Wasser sättigen. Bei der hygroskopischen Beschaffenheit des Materials hatte in dieser Zeit eine derartige Wasseraufnahme stattgefunden, dass die Substanzen als lufttrocken betrachtet werden konnten. Durch längeres Stehenlassen der Proben wurden auffallende Gewichtszunahmen nicht mehr beobachtet.

Grundbedingung für sämtliche analytische Ausführungen und Berechnungen war die genaue Bestimmung der Trocken-

---

1) Dormeyer extrahirte 900—1000 Stunden.

2) Pflüger's Arch. 1897, 65, 102.

3) Ebend. 1894, 55, 352.

substanz. Ca. 1—2 g der lufttrockenen Fleischpulver wurden 8—10 Stunden im Trockenschranke genau bei 100° C. getrocknet, wobei fast in allen Fällen ein constantes Gewicht erreicht wurde. Längeres Erhitzen der angewandten Substanzmengen hatte einen Gewichtsverlust nicht mehr zur Folge.

Die Kohlenstoffbestimmung wurde durch Verbrennung im geschlossenen Rohre mit chromsaurem Blei ausgeführt. Dies geschah deshalb, weil bei Verbrennungen von Fleischsubstanzen, die ich anfangs im offenen Rohre und im Sauerstoffstrom vollzog, minimale Kohlenreste im Schiffchen zurückblieben. Diese Erscheinung wird durch die Fleischasche, welche als Schmelze kleinere Kohlentheilchen umgibt, verursacht. Aus diesem Grunde führte ich im offenen Rohre nur die Wasserstoffbestimmung aus.

Der Stickstoff wurde nach der Kjeldahl'schen Methode bestimmt. Besondere Aufmerksamkeit wurde darauf gerichtet, dass vor dem Erhitzen eine innige Mischung der Substanz mit der Schwefelsäure stattgefunden hatte.

Zur Schwefelbestimmung wurden 1—1,5 g der Substanz mit 25 ccm. rauchender Salpetersäure im zugeschmolzenen Rohre 8 Stunden bei 200° C im Kanonenofen erhitzt. Der Inhalt der Röhre wurde hierauf in eine Abdampfschale gespült und die Salpetersäure auf dem Wasserbade vertrieben. Den trockenen Rückstand nahm ich mit etwa 100 ccm. Wasser auf, machte die Lösung schwach salzsauer und fällte in der Wärme die Schwefelsäure unter Zufügen einer Chlorbaryumlösung aus.

Bei der Aschenbestimmung verfuhr ich genau nach den Angaben von Argutinsky.<sup>1)</sup> Die zu veraschende Muskelsubstanz (1—1,5 g) wurde im Platintiegel anfangs äusserst schwach erhitzt, so dass die Substanz nur wenig rauchte und sich allmählich braun bis dunkelbraun, zuletzt schwarz färbte. Nach tagelangem, vorsichtigem Erhitzen erhielt ich unter öfterem Zerreiben der verkohlten Fleischmasse eine reine weisse Asche. Zu diesem Resultate gelangt man jedoch nur

---

1) Pflüger's Arch. 1894, 55, 353.



stark gesteigert wird, dass die Fleischsubstanz zu einer pechartigen, schwarzen Masse zusammenschmilzt.

Die Fettbestimmung wurde in den mit Aether 480 Stunden extrahirten Muskelpulvern nach der Dormeyer'schen Verdauungsmethode<sup>1)</sup> ausgeführt. Zur Darstellung der Pepsinlösung benutzte ich ein Pepsinpräparat, das in unserem Laboratorium schon zu Verdauungsversuchen gedient hatte und für diese Zwecke als wirksam befunden worden war. Ca. 20 g dieser Substanz waren mit Aether bis zur völligen Erschöpfung an Aetherextract im Soxhletapparat extrahirt worden. Von diesem fettfreien Präparate löste ich 1 g in 500 ccm. 1%iger Salzsäure und nahm zu einem Verdauungsversuche für 1 g Fleischpulver 150 ccm. dieser Lösung. Nach wenigen Stunden war bei 37—38° C. die Fleischsubstanz bis auf geringe Mengen eines flockigen Körpers gelöst. Es wurde abfiltrirt und das Filtrat 5—6 mal im Scheidetrichter mit je 120—150 ccm. Aether ausgeschüttelt. Der flockige Körper wurde nebst Filter im Soxhletapparat einer Extraction unterworfen. Beide Aethermengen wurden vereinigt und gaben nach dem Verdampfen des Aethers die Fettmenge für 1 g der angewandten Substanz.

Um die Gewissheit zu haben, dass nennenswerthe Extractmengen aus der reinen, salzsauren Pepsinlösung mit Aether nicht ausgezogen werden konnten, wurden 150 ccm. derselben 5—6 mal mit je 120—150 ccm. Aether ausgeschüttelt. Bei diesem Versuche wurden 0,0003 g Aetherextract erhalten.

Der Wärmewerth der Fleischsubstanzen wurde auf calorimetrischem Wege nach dem von Berthelot<sup>2)</sup> zuerst angegebenen Verfahren mit Hülfe der Mahler'schen Bombe ermittelt. Eingehendere Untersuchungen über den Energieinhalt der verschiedensten Stoffe führten später F. Stohmann und O. Kellner aus. Das hierbei in Anwendung kommende

---

1) Pflüger's Arch. 1897, 65, 162.

2) Ann. d. Chim. 6. Bd., 546, 10. Bd., 433 u. 13. Bd., 289.

fürlich beschrieben<sup>1)</sup> worden und wird deshalb an dieser Stelle von einer nochmaligen Beschreibung desselben abgesehen.

Im Folgenden sind die für unsere Fleischproben gefundenen Analysenresultate zusammengestellt.

# Nr. I.

## Fleisch vom Halsmuskel eines jungen Ochsen.

### a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

- |   |        |           |
|---|--------|-----------|
| 1. 30,9075 g frisch = 7,2780, trocken = 23,55 % | Tr.-S. | } Mittel: |
| 2. 26,1398 „ „ = 6,1574 „ = 23,56 %             | „ „    |           |
|   |        | 23,56 %.  |

### b) Trockensubstanz und Wasser der lufttrockenen Substanz:

- |  |        |                          |
|--|--------|--------------------------|
| 1. 0,9435 g lufttr. S. = 0,8533 Tr.-S. = 90,44 % | Tr.-S. | } Mittel:                |
| 2. 0,7162 „ „ = 0,6488 „ = 90,59 %               | „ „    |                          |
|  |        | 90,52 % Tr.-S.           |
|  |        | 9,48 % H <sub>2</sub> O. |

### c) Asche in der Trockensubstanz:

- |  |           |
|--|-----------|
| 1. 0,9435 g lufttr. S. = 0,8533 Tr.-S. enth. 0,0454 Asche = 5,32 % | } Mittel: |
| 2. 0,7162 „ „ = 0,6488 „ „ 0,0343 „ = 5,29 %                       |           |
|  | 5,31 %.   |

### d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

- |   |
|---|
| 1. 1 g lufttr. S. = 0,9052 Tr.-S. = 0,8571 afr. Tr.-S. enth. 0,0079 Fett = 0,92 % |
| 2. 1 g „ = 0,9052 „ = 0,8571 „ „ 0,0079 „ = 0,92 %                                |
| Mittel: 0,92 % Fett i. d. Tr.-S.  |

### e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	Mittel
Kohlenstoff <sup>2)</sup>	52,81	52,86	52,84
Wasserstoff	7,21	7,25	7,23
Stickstoff	16,44	16,38	16,41
Schwefel	0,54	—	0,54
Sauerstoff	—	—	22,98
			100,00

### f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

- |   |
|---|
| 1. 0,9990 lufttr. S. = 0,9043 Tr.-S. = 0,8563 afr. Tr.-S. = 4884,9 cal. |
| 1 g „ „ = 5704,7 „  |
| 2. 0,9990 „ = 0,9043 „ = 0,8563 „ = 4870,7 „                            |
| 1 g „ „ = 5688,1 „  |
| Mittel: 5696,4 cal. f. 1 g afr. Tr.-S.                                  |

<sup>1)</sup> Stohmann, Journ. f. prakt. Chem. N. F. 39. Bd., 1889, 503 und 49. Bd., 99. — Berthelot, Prakt. Anl. z. Ausführung thermochem. Messungen, 1893, S. 76. — O. Kellner, Landw. Versuchsst. 1896, 47, 292.

<sup>2)</sup> Die Analysenbelege sind in den Schlusstabellen niedergelegt.

### **Fleisch vom Hinterschenkel desselben Thieres.**

**a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:**

1. 29,6388 frisch = 7,2882 trocken = 24,59%  
 2. 32,1384 „ = 7,8802 „ = 24,52% } Mittel: 24,56%.

**b) Trockensubstanz und Wasser der lufttrockenen Substanz:**

- |           |                     |                  |           |         |                   |
|-----------|---------------------|------------------|-----------|---------|-------------------|
| 1. 1,5358 | lufttr. S. = 1,3926 | Tr.-S. = 90,68 % | } Mittel: | 90,69 % | Tr.-S.            |
| 2. 0,8828 | , = 0,8006          | , = 90,69 %      |           | 9,31 %  | H <sub>2</sub> O. |

**c) Asche in der Trockensubstanz:**

1. 1,5358 lufttr. S. = 1,3926 Tr.-S. enth. 0,0747 Asche = 5,36% } Mittel:  
2. 0,8828 „ = 0,8006 „ „ 0,0450 „ = 5,62% } 5,49%.

**d) Fett in der afr. Trockensubstanz:**

- 1.** 1 g lufttr. S. = 0,9069 Tr.-S. = 0,8571 afr. Tr.-S. enth. 0,0022 Fett = 0,27 %  
**2.** 1 g        »     = 0,9069        »     = 0,8571        »     , 0,0024        »     = 0,27 %  
Mittel: 0,27 %.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	IV.	Mittel
Kohlenstoff	52,92	52,94	—	—	52,93
Wasserstoff	7,10	7,13	—	—	7,12
Stickstoff	16,41	16,55	16,49	16,59	16,51
Schwefel	0,46	0,46	—	—	0,46
Sauerstoff	—	—	—	—	22,98
					<u>100,00</u>

**f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:**

- |                      |                 |                      |                                |
|----------------------|-----------------|----------------------|--------------------------------|
| 1. 0,9970 luftfr. S. | = 0,9042 Tr.-S. | = 0,8546 afr. Tr.-S. | = 4902,4 cal.                  |
|                      |                 | 1 g                  | = 5736,5                       |
| 2. 0,9973            | = 0,9045        | = 0,8548             | = 4917,8                       |
|                      |                 | 1 g                  | = 5753,2                       |
| Mittel:              |                 |                      | 5744,9 cal. f. 1 g afr. Tr.-S. |

**№. III.**

**Fleisch vom Hinterschenkel einer Kuh (A).**

**a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:**

- $$\left. \begin{array}{l} 1. 25,6670 \text{ frisch} = 5,8675 \text{ trocken} = 22,86 \% \\ 2. 29,0948 \text{ „} = 6,6535 \text{ „} = 22,87 \% \end{array} \right\} \text{Mittel: } 22,87 \%.$$

**b) Trockensubstanz und Wasser der lufttrockenen Substanz:**

- $$\begin{array}{lcl} 1. 1,2914 \text{ lufttr. S.} = 1,1975 \text{ Tr.-S.} = 92,73 \% & \left. \vphantom{\begin{array}{l} 1. 1,2914 \text{ lufttr. S.} = 1,1975 \text{ Tr.-S.} = 92,73 \% \\ 2. 1,1544 \text{ } = 1,0696 \text{ } = 92,65 \% \end{array}} \right\} \text{Mittel:} & 92,69 \% \text{ Tr.-S.} \\ 2. 1,1544 \text{ } = 1,0696 \text{ } = 92,65 \% & & 7,31 \% \text{ H}_2\text{O.} \end{array}$$

c) Asche in der Trockensubstanz:

1. 1,2914	lufttr. S. = 1,1975	Tr.-S. enth. 0,0644	Asche = 5,38 %	} Mittel: 5,39 %.
2. 1,1544	„ = 1,0696	„ „ 0,0576	„ = 5,39 %	

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1. 1 g	lufttr. S. = 0,9269	Tr.-S. = 0,8769	afr. Tr.-S. enth. 0,0039	Fett = 0,44 %
2. 1 „	„ = 0,9269	„ = 0,8769	„ „ 0,0042	„ = 0,48 %
				Mittel: 0,46 %.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	Mittel
Kohlenstoff	52,22	—	—	52,22
Wasserstoff	7,19	—	—	7,19
Stickstoff	16,63	16,55	16,59	16,59
Schwefel	0,58	0,58	—	0,58
Sauerstoff	—	—	—	23,42
				100,00

f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

1. 0,9860	lufttr. S. = 0,9139	Tr.-S. = 0,8646	afr. Tr.-S. = 4893,04 cal.
		1 g	„ = 5659,3
2. 0,9854	„ = 0,9134	„ = 0,8642	„ = 4887,5
		1 g	„ = 5655,5
Mittel: 5657,4 cal. f. 1 g afr. Tr.-S.			

Nr. IV.

**Fleisch vom Hinterschenkel einer Kuh (B).**

a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1. 38,2780	frisch = 8,6178	trocken = 22,51 %	} Mittel: 22,55 %.
2. 38,9535	„ = 8,7882	„ = 22,56 %	
3. 41,1114	„ = 9,2764	„ = 22,56 %	
4. 37,1136	„ = 8,3621	„ = 22,53 %	

b) Trockensubstanz und Wasser der lufttrockenen Substanz:

1. 1,6356	lufttr. S. = 1,5232	Tr.-S. = 93,13 %	} Mittel: 93,08 % Tr.-S. 6,92 % H <sub>2</sub> O.
2. 1,3433	„ = 1,2497	„ = 93,03 %	

c) Asche in der Trockensubstanz:

1. 1,6356	lufttr. S. = 1,5232	Tr.-S. enth. 0,0808	Asche = 5,30 %	} Mittel: 5,32 %.
2. 1,3433	„ = 1,2497	„ „ 0,0668	„ = 5,34 %	

d) Fett in der afr. Trockensubstanz.

1. 1 g	lufttr. S. = 0,9308	Tr.-S. = 0,8813	afr. Tr.-S. enth. 0,0076	Fett = 0,86 %
2. 1 „	„ = 0,9308	„ = 0,8813	„ „ 0,0070	„ = 0,79 %
				Mittel: 0,83 %.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	IV.	Mittel
Kohlenstoff	52,82	52,70	—	—	52,76
Wasserstoff	7,18	7,08	—	—	7,18
Stickstoff	16,71	16,78	16,80	16,80	16,77
Schwefel	0,50	0,50	—	—	0,50
Sauerstoff	—	—	—	—	22,84
					<hr/> 100,00

f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

1.	1,1826	lufttr. S.	=	1,1008	Tr. S.	=	1,0422	afr. Tr.-S.	=	5952,6	cal.
							1 g		=	5711,5	
2.	1,1818		=	1,1000		=	1,0415		=	5933,8	
							1 g		=	5697,4	
									Mittel:	5704,5	cal. f. 1 g afr. Tr.-S.

Nr. V.

**Fleisch (Rippenstück) vom Schwein A.**

a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1.	31,7115	frisch	=	8,0715	trocken	=	25,45	%	} Mittel: 25,5 % Tr.-S.
2.	36,9702		=	9,4350		=	25,52	%	
3.	29,0220		=	7,4192		=	25,56	%	
4.	35,6828		=	9,0790		=	25,44	%	

b) Trockensubstanz und Wasser der lufttrockenen Substanz:

1.	1,5221	lufttr. S.	=	1,4027	Tr.-S.	=	92,16	%	} Mittel: 92,06 % Tr.-S.
2.	1,5738		=	1,4473		=	91,96	%	
									7,94 % H <sub>2</sub> O.

c) Asche in der Trockensubstanz:

1.	1,3597	lufttr. S.	=	1,2517	Tr.-S. enth. 0,0664 Asche	=	5,30	%	} Mittel: 5,24 %
2.	1,5738		=	1,4473		=	5,18	%	

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1.	1 g	lufttr. S.	=	0,9206	Tr.-S.	=	0,8707	afr. Tr.-S. enth. 0,0099 Fett	=	1,13	%
2.	1		=	0,9206		=	0,8707		=	0,0123	%
									Mittel:	1,27	%

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	Mittel
Kohlenstoff	53,07	52,80	—	52,94
Wasserstoff	7,25	7,07	—	7,16
Stickstoff	16,52	16,50	16,51	16,51
Schwefel	0,53	0,56	—	0,55
Sauerstoff	—	—	—	22,84
				<hr/> 100,00



## Hammelfleisch A, der Keule entnommen.

### a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1.	18,0718	frisch	=	4,3392	trocken	=	24,01	%	} Mittel: 24,02 %.
2.	23,1132	>	=	5,5418	>	=	23,98	%	
3.	13,4320	>	=	3,2193	>	=	23,95	%	
4.	14,1172	>	=	3,4026	>	=	24,10	%	

### b) Trockensubstanz und Wasser in der lufttrockenen Substanz:

1.	1,2470	lufttr. S.	=	1,1286	Tr.-S.	=	90,51	%	} Mittel: 90,36 % Tr.-S. 9,64 % H <sub>2</sub> O.
2.	1,1106	>	=	1,0018	>	=	90,20	%	

### c) Asche in der Trockensubstanz:

1.	1,2470	lufttr. S.	=	1,1286	Tr.-S. enth. 0,0586 Asche	=	5,19	%	} Mittel: 5,19 %.
2.	1,1106	>	=	1,0018	>	=	0,0520	%	

### d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1.	1 g	lufttr. S.	=	0,9036	Tr.-S.	=	0,8567	afr. Tr.-S. enth. 0,0100 Fett	=	1,17	%.
----	-----	------------	---	--------	--------	---	--------	-------------------------------	---	------	----

### e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	Mittel
Kohlenstoff	52,50	52,87	—	52,69
Wasserstoff	7,30	7,35	—	7,33
Stickstoff	16,34	16,16	16,19	16,23
Schwefel	0,66	0,65	—	0,66
Sauerstoff	—	—	—	23,09
				100,00

### f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

1.	1,1297	lufttr. S.	=	1,0208	Tr.-S.	=	0,9678	afr. Tr.-S.	=	5482,5	cal.
							1 g	>	=	5664,9	>
2.	1,0086	lufttr. S.	=	0,9114	Tr.-S.	=	0,8641	afr. Tr.-S.	=	4893,6	cal.
							1 g	>	=	5663,2	>
									Mittel:	5664,1	cal. f. 1 g afr. Tr.-S.

## Nr. VIII.

### Hammelfleisch B, ebenfalls der Keule entnommen.

#### a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1.	26,2806	frisch	=	6,2766	trocken	=	23,88	%	} Mittel: 23,94 %.
2.	24,7902	>	=	5,9554	>	=	24,02	%	
3.	40,1448	>	=	9,5920	>	=	23,89	%	
4.	34,9693	>	=	8,3783	>	=	23,94	%	

b) Trockensubstanz und Wasser der lufttrockenen Substanz:

1. 1,2465 lufttr. S. = 1,1366 Tr.-S. = 91,183 % } Mittel: 91,19% Tr.-S.  
 2. 1,7642 „ „ = 1,6089 „ = 91,197 % } 8,81% H<sub>2</sub>O.

c) Asche in der Trockensubstanz:

1. 1,2465 lufttr. S. = 1,1366 Tr.-S. enth. 0,0607 Asche = 5,34 % } Mittel:  
 2. 1,7642 „ „ = 1,6089 „ „ 0,0868 „ = 5,39 % } 5,37%.

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1. 1 g lufttr. S. = 0,9119 Tr.-S. = 0,8629 afr. Tr.-S. enth. 0,0139 Fett = 1,61 %,  
 2. 1 g lufttr. S. = 0,9119 Tr.-S. = 0,8629 afr. Tr.-S. enth. 0,0138 Fett = 1,60 %,  
 Mittel: 1,61 %.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	Mittel
Kohlenstoff	53,12	52,94	—	53,03
Wasserstoff	7,15	7,23	—	7,19
Stickstoff	16,60	16,56	16,57	16,58
Schwefel	0,71	0,69	—	0,70
Sauerstoff	—	—	—	22,50
				<u>100,00</u>

f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

1. 1,1808 lufttr. S. = 1,0768 Tr.-S. = 1,0190 afr. Tr.-S. = 5824,97 cal.  
 1 g „ „ = 5716,4 „  
 2. 1) 1,2034 lufttr. S. = 1,0799 Tr.-S. = 1,0219 afr. Tr.-S. = 5848,59 cal.  
 1 g „ „ = 5723,3 „  
 3. 1,2055 lufttr. S. = 1,0818 Tr.-S. = 1,0237 afr. Tr.-S. = 5857,5 cal.  
 1 g „ „ = 5720,5 „  
 Mittel: 5720,1 cal. f. 1 g afr. Tr.-S.

Nr. IX.

**Fleisch von Kaninchen.**

a) Trockensubstanz<sup>2)</sup> des frischen Fleisches:

1. 12,1461 frisch = 3,0764 trocken = 25,32 % } Mittel: 25,32 %.  
 2. 9,7086 „ = 2,4578 „ = 25,32 % }

1) Die Verbrennungen 2 und 3 wurden ca.  $\frac{1}{2}$  Jahr nach der ersten Bestimmung ausgeführt; die Trockensubstanz wurde neu bestimmt und der Werth 89,74 % gefunden.

2) Nur bei dieser Probe gelang das Trocknen im evacuirten Exsiccator über Schwefelsäure; in der Anwendung der geringen Mengen an frischer Substanz ist diese Erscheinung begründet.



1. 1,0942 lufttr. S. = 0,9908 Tr.-S. = 90,55 % } Mittel: 90,575 % Tr.-S.  
 2. 1,2696 „ „ = 1,1503 „ = 90,60 % } 9,425 % H<sub>2</sub>O.

c) Asche in der Trockensubstanz:

1. 1,0942 lufttr. S. = 0,9908 Tr.-S. enth. 0,0527 Asche = 5,32 % } Mittel:  
 2. 1,2696 „ „ = 1,1503 „ „ 0,0614 „ = 5,34 % } 5,33 %.

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1. 1 g lufttr. S. = 0,9058 Tr.-S. = 0,8575 afr. Tr.-S. enth. 0,0087 Fett = 1,01 %.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	Mittel
Kohlenstoff	52,83	53,31	53,07
Wasserstoff	7,20	7,08	7,14
Stickstoff	16,71	16,72	16,72
Schwefel	—	—	—
Sauerstoff	—	—	—

f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

1. 1,0195 lufttr. S. = 0,9234 Tr.-S. = 0,8742 afr. Tr.-S. = 4929,9 cal.  
 1 g „ „ = 5639,3 „

Nr. X.

**Fleisch von demselben Kaninchen (im Soxhlet-Apparat getrocknet).**

a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1. 25,9774 frisch = 6,5690 trocken = 25,29 % }  
 2. 29,6284 „ = 7,5137 „ = 25,36 % } Mittel: 25,33 %.  
 3. 21,8160 „ = 5,5292 „ = 25,35 % }

b) Trockensubstanz und Wasser der luftgetrockneten Substanz:

1. 1,6613 lufttr. S. = 1,5355 Tr.-S. = 92,43 % } Mittel: 92,51 % Tr.-S.  
 2. 1,2112 „ „ = 1,1213 „ = 92,58 % } 7,49 % H<sub>2</sub>O.

c) Asche in der afr. Trockensubstanz:

1. 1,6613 lufttr. S. = 1,5355 Tr.-S. enth. 0,0870 Asche = 5,67 % } Mittel:  
 2. 1,2112 „ „ = 1,1213 „ „ 0,0609 „ = 5,43 % } 5,55 %.

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1. 1 g lufttr. S. = 0,9251 Tr.-S. = 0,8738 afr. Tr.-S. enth. 0,0089 Fett = 1,12 %,  
 2. 1 g lufttr. S. = 0,9251 Tr.-S. = 0,8738 afr. Tr.-S. enth. 0,0105 Fett = 1,20 %,  
 Mittel: 1,16 %.

	I.	II.	III.	Mittel
Kohlenstoff	52,95	53,24	—	53,01
Wasserstoff	7,12	7,22	—	7,17
Stickstoff	16,68	16,69	16,79	16,72
Schwefel	0,41	0,41	—	0,42
Sauerstoff	—	—	—	22,68
				100,00

f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

- 1,0564 lufttr. S. = 0,9773 Tr.-S. = 0,9231 afr. Tr.-S. = 5241,9 cal.  
1 g „ „ = 5678,5 „
  - 1,0840 lufttr. S. = 1,0028 Tr.-S. = 0,9471 afr. Tr.-S. = 5376,8 cal.  
1 g „ „ = 5677,1 „
- Mittel: 5677,8 cal. f. 1 g afr. Tr.-S.

Nr. XI.

Fleisch von einem alten Huhn (A).

a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

- 27,5328 frisch = 7,0228 trocken = 25,51 %
  - 34,1946 „ = 8,7511 „ = 25,59 %
  - 29,6345 „ = 7,5831 „ = 25,59 %
  - 37,6350 „ = 9,5990 „ = 25,51 %
- Mittel: 25,55 %.

b) Trockensubstanz in der lufttrockenen Substanz:

- 1,2580 lufttr. S. = 1,1888 Tr.-S. = 94,50 %
  - 1,6432 „ „ = 1,5512 „ = 94,40 %
- Mittel: 94,45 % Tr.-S.  
5,55 % H<sub>2</sub>O.

c) Asche in der Trockensubstanz:

- 1,2580 lufttr. S. = 1,1888 Tr.-S. enth. 0,0638 Asche = 5,37 %
  - 1,4746 „ „ = 1,3944 „ „ 0,0756 „ = 5,40 %
- Mittel: 5,40 %.

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

- 1 g lufttr. S. = 0,9445 Tr.-S. = 0,8935 afr. Tr.-S. enth. 0,0112 Fett = 1,25 %
  - 1 g „ „ = 0,9445 „ „ = 0,8935 „ „ 0,0117 „ = 1,31 %
- Mittel: 1,28 %.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

	I.	II.	III.	IV.	Mittel
Kohlenstoff	52,85	52,83	—	—	52,84
Wasserstoff	7,01	7,00	—	—	7,01
Stickstoff	16,68	16,66	16,64	16,67	16,66
Schwefel	0,47	0,47	—	—	0,47
Sauerstoff	—	—	—	—	23,02
					100,00

- 1 g „ „ = 5659,2 „  
 2. 1,2067 lufttr. S.<sup>1)</sup> = 1,1240 Tr.-S. = 1,0634 afr. Tr.-S. = 6035,7 cal.  
 1 g „ „ = 5675,9 „  
 3. 1,2061 lufttr. S. = 1,1226 Tr.-S. = 1,0620 afr. Tr.-S. = 6008,9 cal.  
 1 g „ „ = 5658,2 „  
 Mittel: 5664,4 cal. f. 1 g afr. Tr.-S.

## Nr. XII.

### Fleisch von einem jungen Huhn (B).

#### a) Trockensubstanz des frischen Fleisches.

- |  |                    |
|--|--------------------|
| 1. 33,0780 frisch = 8,1843 trocken = 24,74 % | } Mittel: 24,73 %. |
| 2. 30,0914 „ = 7,4154 „ = 24,64 %            |                    |
| 3. 34,7496 „ = 8,6078 „ = 24,77 %            |                    |
| 4. 32,7335 „ = 8,1030 „ = 24,75 %            |                    |

#### b) Trockensubstanz in der lufttrockenen Substanz:

- |  |   |
|--|---|
| 1. 1,1452 lufttr. S. = 1,0566 Tr.-S. = 92,21 % | } Mittel: 92,24 % Tr.S.<br>7,76 % H <sub>2</sub> O. |
| 2. 1,3980 „ = 1,2900 „ = 92,27 %               |   |

#### c) Asche in der Trockensubstanz:

- |  |                   |
|--|-------------------|
| 1. 1,1452 lufttr. S. = 1,0566 Tr.-S. enth. 0,0539 Asche = 5,10 % | } Mittel: 5,20 %. |
| 2. 1,3980 „ = 1,2900 „ „ 0,0682 „ = 5,29 %                       |                   |

#### d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

- |   |
|---|
| 1. 1 g lufttr. S. = 0,9224 Tr.-S. = 0,8744 afr. Tr.-S. enth. 0,0147 Fett = 1,68 % |
| 2. 1 g „ „ = 0,9224 „ = 0,8744 „ „ „ 0,0130 „ = 1,49 %                            |
| Mittel: 1,59 %.   |

#### e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

Kohlenstoff	52,58	52,55	—	52,57
Wasserstoff	7,21	6,99	—	7,10
Stickstoff	16,60	16,61	16,61	16,61
Schwefel	0,50	0,51	—	0,51
Sauerstoff	—	—	—	23,21
				100,00

#### f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

- |   |
|---|
| 1. 1,2034 lufttr. S. = 1,1100 Tr.-S. = 1,0528 afr. Tr.-S. = 5973,8 cal. |
| 1 g „ „ = 5678,5 „  |

<sup>1)</sup> Die Bestimmungen 2 und 3 wurden ca.  $\frac{1}{4}$  Jahr später als Untersuchung 1 ausgeführt, die lufttrockene Substanz enthielt dabei 93,08 % Tr.-S.

Nr. XIII.

**Fleisch von der Brustmuskulatur eines Pferdes (A).**

a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1.	31,9518	frisch	=	7,0558	trocken	=	22,08 %	} Mittel: 22,09 %.
2.	33,9133	»	=	7,4873	»	=	22,08 %	
3.	37,1086	»	=	8,2056	»	=	22,11 %	
4.	34,7092	»	=	7,6638	»	=	22,08 %	

b) Trockensubstanz der lufttrockenen Substanz:

1.	1,1840	lufttr. S.	=	1,0755	Tr.-S.	=	90,84 %	} Mittel: 90,84% Tr.-S. 9,16% H <sub>2</sub> O.
2.	1,5040	»	=	1,3662	»	=	90,84 %	

c) Asche in der Trockensubstanz:

1.	1,3520	lufttr. S.	=	1,2282	Tr.-S. enth. 0,0630 Asche	=	5,13 %	} Mittel: 5,16 %.
2.	1,2883	»	=	1,1703	» » 0,0608	=	5,19 %	

d) Fett in der afr. Trockensubstanz:

1.	1 g	lufttr. S.	=	0,9084	Tr.-S.	=	0,8615	afr. Tr.-S. enth.	0,0107	Fett	=	1,24%
2.	1 g	»	=	0,9084	»	=	0,8615	»	0,0116	»	=	1,35%
											Mittel:	1,30%.

e) Elementarzusammensetzung der afr. Trockensubstanz:

Kohlenstoff	53,34	52,98	—	—	53,16
Wasserstoff	7,26	7,23	—	—	7,25
Stickstoff	15,48	15,49	15,47	15,47	15,48
Schwefel	0,65	0,62	—	—	0,64
Sauerstoff	—	—	—	—	23,47
					100,00

f) Wärmewerth der afr. Trockensubstanz:

1.	1,2786	lufttr. S.	=	1,1615	Tr.-S.	=	1,1016	afr. Tr.-S.	=	6208,4 cal.
							1 g	»	=	5635,8
2.	1,4005	»	=	1,2722	»	=	1,2066	»	=	6789,1
							1 g	»	=	5626,7
Mittel: 5631,3 cal. f. 1 g afr. Tr.-S.										

Nr. XIV.

**Fleisch vom Hinterschenkelmuskel desselben Pferdes (A).**

a) Trockensubstanz des frischen Fleisches:

1.	56,9455	frisch	=	12,9150	trocken	=	22,68 %.
----	---------	--------	---	---------	---------	---	----------





Rindfleisch:

	Aschehaltige Trockensubstanz					
	C	H	N	S	O	Asche
Rubner . . . . .	50,46	7,6	15,4	20,97		5,5
Stohmann . . . . .	49,25	6,91	15,49	23,03		5,32
Argutinsky . . . . .	49,6	6,9	15,3	23,0		5,2
Meine Zahlen (Mittel von Fleisch I—IV) . . . .	49,86	6,78	15,68	0,50	21,80	5,38
				22,3		

	Aschefreie Trockensubstanz					
	C	H	N	S	O	Wärmewert
Rubner . . . . .	53,40	8,04	16,30	22,19		5656,9 cal.
Stohmann . . . . .	52,02	7,30	16,36	24,32		5640,9 "
Argutinsky . . . . .	52,33	7,30	16,15	24,22		—
Meine Zahlen (Mittel von Fleisch I—IV) . . . .	52,69	7,17	16,57	0,52	23,05	5700,8 "
				23,57		

Zum Schluss hebe ich noch hervor, dass ich die Fleischpulver auf ihren Glycogengehalt geprüft habe. Sie erwiesen sich sämtlich als glycogenhaltig, die Fleischproben I—XII jedoch in so geringem Maasse, dass bei Anwendung von 1 bis 2 g der lufttrockenen Substanz kaum wägbare Mengen an Glycogen erhalten wurden. Die Pferdefleischproben jedoch lieferten grössere Glycogenmengen, deshalb wurde in den Proben XIII und XV das Glycogen quantitativ bestimmt, und zwar nach der von E. Pflüger<sup>1)</sup> verbesserten Brücke-Külz'schen Methode.

1) Pflüger's Arch. 1899, S. 75, 240.

Die dazu nothwendigen Reagentien und Lösungen wurden genau nach Pflüger's Angaben hergestellt, ebenso hielt ich mich bei der Ausführung der Glycogenbestimmung streng an seine Vorschriften. Durch die vorausgegangenen analytischen Bestimmungen waren leider die Substanzmengen der Analysirproben ziemlich aufgebraucht worden und konnten daher im günstigsten Falle nur 3 g der lufttrockenen Substanz zu einer Glycogenanalyse benutzt werden. Es wurden folgende Glycogenmengen gefunden:

Pferdefleisch:

	Angew.lufttr. Substanz <sup>1)</sup>	Tr.-S.	Afr. Tr.-S.	Glycogen	Glycogen d. afr. Tr.-S.
	g	g	g	g	%
XIII {	1 2,5	2,2135	2,0993	0,0797	3,80
	2 2,5	2,2135	2,0993	0,0765	3,64
					} 3,72%.
XV {	1 3,0	2,6646	2,5378	0,0900	3,55
	2 3,0	2,6646	2,5378	0,0917	3,61
					} 3,58%.

Die gefundenen Werthe 3,72% und 3,58% sind nach Pflüger's Vorschrift um 12% als Correctur wegen des stattgehabten Verlustes an Glycogen bei der Ausführung zu erhöhen. Da es mir in Folge des schon angedeuteten Substanzmangels nicht möglich war, meine gefundenen Glycogenwerthe eingehender auf ihre Richtigkeit zu prüfen, halte ich dieselben mit der Pflüger'schen Correctur nicht für so einwandfrei, um darauf bei der Berechnung meiner Pferdefleischanalysen Rücksicht zu nehmen.

<sup>1)</sup> XII 88,54% Tr.-S. und 5,16% Asche.

XV 88,82% „ „ 4,76% „



Bezeichnung der Fleischproben	Die aschefreie Fleisch-Tr.-S. <sup>1)</sup> enthält:					Wärmewerth f. 1 g Subst. cal.	F (n ber o
	C o/o	H o/o	N o/o	S o/o	O o/o		
I.							
Ochse (Halsmuskel)	52,84	7,23	16,41	0,54	22,98	5696,4	0
II.							
Ochse (Hinterschenkel)	52,93	7,12	16,51	0,46	22,98	5744,9	0
III.							
Kuh A (Hinterschenkel)	52,22	7,19	16,59	0,58	23,42	5657,5	0
IV.							
Kuh B (Hinterschenkel)	52,76	7,13	16,77	0,50	22,84	5704,5	0
V.							
Schwein A (Rippenstück)	52,94	7,16	16,51	0,55	22,84	5730,1	1
VI.							
Schwein B (Vorderschenkel)	53,01	7,28	16,31	0,60	22,80	5708,6	1
VII.							
Hammel A (Keule)	52,69	7,33	16,23	0,66	23,09	5664,1	1
VIII.							
Hammel B (Keule)	53,03	7,19	16,58	0,70	22,50	5720,1	1
IX.							
Kaninchen (im Vacuum getrocknet)	53,07	7,14	16,72	—	—	5639,3	1
X.							
Dasselbe Kaninchen- fleisch (im Soxhlet-App. getrocknet)	53,01	7,17	16,72	0,42	22,68	5677,8	1
XI.							
Huhn A (alt)	52,84	7,01	16,66	0,47	23,02	5664,4	1
XII.							
Huhn B (jung)	52,57	7,10	16,61	0,51	23,21	5681,0	1
XIII.							
Pferd A (Brust)	53,16	7,25	15,48	0,64	23,47	5631,3	1
XIV.							
Pferd A (Hinterschenkel)	52,61	7,11	15,24	0,69	24,35	5620,4	1
XV.							
Pferd B (Hinterschenkel)	53,08	7,18	15,31	0,57	23,86	5698,4	1

1) 480 St. mit Aether extrahirt.

B

Für die asche- und fettfreie Fleisch-Tr.-S. berechnet:1)

C	H	N	S	O	Wärmewerth f. 1 g Subst.
52,62	7,20	16,56	0,54	23,08	5661,2
52,86	7,11	16,55	0,46	23,02	5734,8
52,11	7,16	16,67	0,58	23,48	5639,8
52,58	7,10	16,90	0,50	22,92	5674,4
52,64	7,10	16,72	0,56	22,98	5681,8
52,77	7,23	16,47	0,61	22,92	5669,7
52,40	7,27	16,42	0,67	23,24	5618,9
52,65	7,11	16,85	0,71	22,68	5658,5
52,82	7,09	16,88	—	—	5600,1
52,82	7,11	16,92	0,42	22,73	5633,1
52,53	6,95	16,88	0,48	23,16	5614,9
52,18	7,02	16,88	0,52	23,40	5619,6
52,85	7,18	15,68	0,65	23,64	5580,6
52,29	7,00	15,45	0,70	24,56	5567,6
52,77	7,11	15,51	0,58	24,03	5648,9

1) Fett = 76,5 C, 12,0 H, 11,5 O. 9484,5 cal. const. Vol. 9500,0 cal. const.

Druck. Stohmann u. Langbein, Journ. f. prakt. Chem. 1890, N. F. 42, 362.

Kohlenstoff.					
Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	CO <sub>2</sub> g	C g	% C der afr. Tr.-S.	Mittel
I	1) 0,5210 lfttr.				
	= 0,4716 Tr. S.				
	= 0,4466 afr. Tr.-S.	0,8648	0,23583096	52,81	} 52,84 %
	2) 0,4585 lfttr.				
	= 0,41503 Tr.-S.				
	= 0,39299 afr. Tr.-S.	0,7618	0,20774286	52,86	
II	1) 0,4634 lfttr.				
	= 0,4203 Tr.-S.				
	= 0,3972 afr. Tr.-S.	0,7708	0,21019716	52,92	} 52,93 %
	2) 0,5487 lfttr.				
	= 0,4976 Tr.-S.				
	= 0,4703 afr. Tr.-S.	0,9130	0,2489751	52,94	
III	1) 0,4186 lfttr.				
	= 0,3880 Tr.-S.				
	= 0,3671 afr. Tr.-S.	0,7030	0,1917081	52,22	52,22 %
IV	1) 0,5356 lfttr.				
	= 0,4985 Tr.-S.				
	= 0,4720 afr. Tr.-S.	0,9143	0,24932961	52,82	} 52,76 %
	2) 0,5601 lfttr.				
	= 0,5213 Tr.-S.				
	= 0,4936 afr. Tr.-S.	0,9539	0,26012853	52,70	
V	1) 0,6816 lfttr.				
	= 0,6275 Tr.-S.				
	= 0,5946 afr. Tr.-S.	1,1572	0,31556844	53,07	} 52,94 %
	2) 0,7468 lfttr.				
	= 0,6875 Tr.-S.				
	= 0,6515 afr. Tr.-S.	1,2615	0,34401105	52,80	
VI	1) 0,7378 lfttr.				
	= 0,6696 Tr.-S.				
	= 0,6317 afr. Tr.-S.	1,2299	0,33539373	53,09	} 53,01 %
	2) 0,7735 lfttr.				
	= 0,7020 Tr.-S.				
	= 0,6623 afr. Tr.-S.	1,2853	0,35050131	52,92	

**Wasserstoff.**

Angew. Fleischsubstanz		H <sub>2</sub> O	H	% H der afr. Tr.-S.	Mittel
g		g	g		
1)	0,5210 lfttr.	0,3390			} 7,23 %
	= 0,4716 Tr.-S.				
	= 0,4466 afr. Tr.-S.	0,2896	0,03218	7,21	
2)	0,4585 lfttr.	0,2998			
	= 0,41503 Tr.-S.				
	= 0,39299 afr. Tr.-S.	0,2563	0,02848	7,25	
1)	0,4634 lfttr.	0,2968			} 7,12 %
	= 0,4203 Tr.-S.				
	= 0,3972 afr. Tr.-S.	0,25366	0,028184	7,10	
2)	0,5487 lfttr.	0,3529			
	= 0,4976 Tr.-S.				
	= 0,4703 afr.-Tr.-S.	0,30182	0,0335355	7,13	
1)	0,4186 lfttr.	0,2682			} 7,19 %
	= 0,3880 Tr.-S.				
	= 0,3671 afr. Tr.-S.	0,2376	0,0264	7,19	
1)	0,4978 lfttr.	0,3178			} 7,13 %
	= 0,4634 Tr.-S.				
	= 0,4387 afr. Tr.-S.	0,2834	0,031488	7,18	
2)	0,4789 lfttr.	0,3021			
	= 0,4458 Tr.-S.				
	= 0,4222 afr. Tr.-S.	0,2690	0,02988	7,08	
1)	0,5729 lfttr.	0,3718			} 7,16 %
	= 0,5274 Tr.-S.				
	= 0,4998 afr. Tr.-S.	0,3263	0,036255	7,25	
2)	0,6452 lfttr.	0,4093			
	= 0,5940 Tr.-S.				
	= 0,5629 afr. Tr.-S.	0,3581	0,039789	7,07	
1)	0,4966 lfttr.	0,3221			} 7,28 %
	= 0,4507 Tr.-S.				
	= 0,4252 afr. Tr.-S.	0,2762	0,030689	7,22	
2)	0,5002 lfttr.	0,3287			
	= 0,4539 Tr.-S.				
	= 0,4282 afr. Tr.-S.	0,2824	0,031378	7,33	

Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	CO <sub>2</sub> g	C g	% C der afr. Tr.-S.	Mitte
VII	1) 0,6169 lfttr.	1,0175	0,27747225	52,50	52,69
	= 0,5574 Tr.-S.				
	= 0,5285 afr. Tr.-S.				
	2) 0,5900 lfttr.	0,9798	0,26719146	52,87	
	= 0,5331 Tr.-S.				
= 0,5054 afr. Tr.-S.					
VIII	1) 0,6733 lfttr.	1,1317	0,30861459	53,12	53,03
	= 0,6140 Tr.-S.				
	= 0,5810 afr. Tr.-S.				
	2) 0,6761 lfttr.	1,1325	0,30883275	52,94	
	= 0,6165 Tr.-S.				
= 0,5834 afr. Tr.-S.					
IX	1) 0,5282 lfttr.	0,8774	0,23926698	52,83	53,07
	= 0,4784 Tr.-S.				
	= 0,4529 afr. Tr.-S.				
	2) 0,5132 lfttr.	0,8602	0,23457654	53,31	
	= 0,4648 Tr.-S.				
= 0,4400 afr. Tr.-S.					
X	1) 0,6087 lfttr.	1,0334	0,28180818	52,95	53,10
	= 0,5631 Tr.-S.				
	= 0,5324 afr. Tr.-S.				
	2) 0,5038 lfttr.	0,8594	0,23435838	53,24	
	= 0,4661 Tr.-S.				
= 0,4402 afr. Tr.-S.					
XI	1) 0,7501 lfttr.	1,2991	0,35426457	52,85	52,84
	= 0,7085 Tr.-S.				
	= 0,6703 afr. Tr.-S.				
	2) 0,8348 lfttr.	1,4451	0,39407877	52,83	
	= 0,7885 Tr.-S.				
= 0,7460 afr. Tr.-S.					
XII	1) 0,7431 lfttr.	1,2528	0,34163856	52,58	52,57
	= 0,6854 Tr.-S.				
	= 0,6498 afr. Tr.-S.				
	2) 0,6462 lfttr.	1,0890	0,2969703	52,55	
	= 0,5961 Tr.-S.				
= 0,5651 afr. Tr.-S.					



Belege (Fortsetzung).

Wasserstoff				
Angew. Fleischsubstanz	H <sub>2</sub> O	H	% H der afr. Tr.-S.	Mittel
g	g	g		
1) 0,4136 lfttr. = 0,3737 Tr.-S. = 0,3543 afr. Tr.-S.	0,2693  0,2294	  0,02588	  7,30	7,33 %
2) 0,5179 lfttr. = 0,4680 Tr.-S. = 0,4437 afr. Tr.-S.	0,3345  0,2846	  0,031622	  7,35	
1) 0,4685 lfttr. = 0,4272 Tr.-S. = 0,4043 afr. Tr.-S.	0,3015  0,2602	  0,028911	  7,15	7,19 %
2) 0,5068 lfttr. = 0,4622 Tr.-S. = 0,4374 afr. Tr.-S.	0,3292  0,2846	  0,031622	  7,23	
1) 0,3551 lfttr. = 0,3216 Tr.-S. = 0,3045 afr. Tr.-S.	0,2308  0,1973	  0,021922	  7,20	7,14 %
2) 0,4351 lfttr. = 0,3941 Tr.-S. = 0,3731 afr. Tr.-S.	0,2789  0,2379	  0,026433	  7,08	
1) 0,4270 lfttr. = 0,3950 Tr.-S. = 0,3731 afr. Tr.-S.	0,2710  0,2390	  0,026555	  7,12	7,17 %
2) 0,5030 lfttr. = 0,4653 Tr.-S. = 0,4395 afr. Tr.-S.	0,3242  0,2865	  0,031722	  7,22	
1) 0,5788 lfttr. = 0,5467 Tr.-S. = 0,5172 afr. Tr.-S.	0,3585  0,3264	  0,036266	  7,01	7,01 %
2) 0,4433 lfttr. = 0,4187 Tr.-S. = 0,3961 afr. Tr.-S.	0,2740  0,2494	  0,027711	  7,00	
1) 0,4114 lfttr. = 0,3795 Tr.-S. = 0,3598 afr. Tr.-S.	0,2655  0,2336	  0,025955	  7,21	7,10 %
2) 0,5927 lfttr. = 0,5467 Tr.-S. = 0,5183 afr. Tr.-S.	0,3728  0,3268	  0,03622	  6,99	

Kohlenstoff

Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	CO <sub>2</sub> g	C g	% C der afr. Tr.-S.	Mittel
XIII	1) 0,7043 lfttr.				
	= 0,6398 Tr.-S.				
	= 0,6068 afr. Tr.-S.	1,1870	0,3236949	53,34	53,16 °
	2) 0,6626 lfttr.				
	= 0,6019 Tr.-S.				
	= 0,5708 afr. Tr.-S.	1,1089	0,30239703	52,98	
XIV	1) 0,6351 lfttr.				
	= 0,5657 Tr.-S.				
	= 0,5376 afr. Tr.-S.	1,0386	0,28322622	52,68	52,61 °
	2) 0,6258 lfttr.				
	= 0,5575 Tr.-S.				
	= 0,5298 afr. Tr.-S.	1,0202	0,27820854	52,53	
XV	1) 0,7238 lfttr.				
	= 0,6503 Tr.-S.				
	= 0,6193 afr. Tr.-S.	1,2021	0,32781267	52,93	53,08 °
	2) 0,7200 lfttr.				
	= 0,6469 Tr.-S.				
	= 0,6161 afr. Tr.-S.	1,2023	0,32786721	53,22	

1 ccm. NaOH Y = 0,003084 N.

1 „ „ Z = 0,003143 „

1 „ „ E = 0,003257 „

1 „ „ F = 0,003080 „

1 „ „ K = 0,003498 „

1 „ „ L = 0,003484 „

Stickstoff

Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	entspr. ccm. Lauge	N g	% N der afr. Tr.-S.	Mittel
I	1) 0,6210 lfttr.				
	= 0,5621 Tr.-S.				
	= 0,5322 afr. Tr.-S.	23,375 Y	0,0875085	16,44	16,41 °
	2) 0,5235 lfttr.				
	= 0,4738 Tr.-S.				
	= 0,4496 afr. Tr.-S.	23,875 Y	0,0736305	16,38	

Belege (Fortsetzung).

Wasserstoff				
Angew. Fleischsubstanz g	H <sub>2</sub> O g	H g	% H der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 0,4746 lfttr. = 0,4311 Tr.-S. = 0,4089 afr. Tr.-S.	0,3107 0,2672 0,2624	0,029688	7,26	} 7,25 %
2) 0,4331 lfttr. = 0,3934 Tr.-S. = 0,3731 afr. Tr.-S.	0,2427	0,026966	7,23	
1) 0,4312 lfttr. = 0,3841 Tr.-S. = 0,3650 afr. Tr.-S.	0,2806 0,2334	0,025933	7,11	} 7,11 %
2) 0,3238 lfttr. = 0,2884 Tr.-S. = 0,2741 afr. Tr.-S.	0,2109 0,1755	0,0195	7,11	
1) 0,4560 lfttr. = 0,4097 Tr.-S. = 0,3902 afr.-Tr.-S.	0,3040 0,2577	0,028633	7,34	} 7,18 %
2) 0,4798 lfttr. = 0,4311 Tr.-S. = 0,4106 afr. Tr.-S.	0,3080 0,2593	0,028811	7,01	

Schwefel				
Angew. Fleischsubstanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S g	% S der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 0,6075 lfttr. = 0,5499 Tf.-S. = 0,5207 afr. Tr.-S.	0,0206	0,00283353	0,54	0,54 %



Stickstoff					
Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	entspr. ccm. Lauge	N g	% N der afr. Tr.-S.	Mittel
II	1) 0,7083 lfttr. = 0,6424 Tr.-S. = 0,6071 afr. Tr.-S.	32,300 Y	0,0996132	16,41	16,51 °
	2) 0,6468 lfttr. = 0,5866 Tr.-S. = 0,5544 afr. Tr.-S.				
	3) 0,6502 lfttr. = 0,5897 Tr.-S. = 0,5573 afr. Tr.-S.	29,750 Y	0,091749	16,55	
	4) 0,6014 lfttr. = 0,5454 Tr.-S. = 0,5155 afr. Tr.-S.				
		30,800 Y	0,0919032	16,49	
		27,725 Y	0,0855039	16,59	
III	1) 0,6072 lfttr. = 0,5628 Tr.-S. = 0,5325 afr. Tr.-S.	28,175 Z	0,088554025	16,63	16,59 °
	2) 0,5739 lfttr. = 0,5319 Tr.-S. = 0,5032 afr. Tr.-S.				
	3) 0,6346 lfttr. = 0,5882 Tr.-S. = 0,5565 afr. Tr.-S.	26,500 Z	0,0832895	16,55	
		29,375 Z	0,092325625	16,59	
IV	1) 0,7298 lfttr. = 0,6793 Tr.-S. = 0,6432 afr. Tr.-S.	34,200 Z	0,1074906	16,71	16,77 °
	2) 0,6593 lfttr. = 0,6137 Tr.-S. = 0,5811 afr. Tr.-S.				
	3) 0,6624 lfttr. = 0,6166 Tr.-S. = 0,5838 afr. Tr.-S.	31,025 Z	0,097511575	16,78	
	4) 0,6440 lfttr. = 0,5994 Fr.-S. = 0,5675 afr. Tr.-S.				
		31,200 Z	0,0980616	16,80	
		30,325 Z	0,095311475	16,80	

Belege (Fortsetzung).

Schwefel

Angew. Fleischsubstanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S g	% S der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 0,9967 lfttr. = 0,9039 Tr.-S. = 0,8543 afr. Tr.-S.	0,0288	0,00396144	0,46	} 0,46 %
2) 1,0224 lfttr. = 0,9272 Tr.-S. = 0,8763 afr. Tr.-S.	0,0295	0,004057725	0,46	
1) 0,8740 lfttr. = 0,8101 Tr.-S. = 0,7664 afr. Tr.-S.	0,0323	0,00442865	0,58	} 0,58 %
2) 0,7745 lfttr. = 0,7179 Tr.-S. = 0,6792 afr. Tr.-S.	0,0286	0,00393393	0,58	
1) 1,0370 lfttr. = 0,9652 Tr.-S. = 0,9139 afr. Tr.-S.	0,0331	0,004552905	0,50	} 0,50 %
2) 1,0265 lfttr. = 0,9555 Tr.-S. = 0,9047 afr. Tr.-S.	0,0328	0,00451164	0,50	

Stickstoff							
Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	entspr. ccm. Lauge	N g	% N der afr. Tr.-S.	Mittel		
V	1) 0,8640 lfttr. = 0,7954 Tr.-S. = 0,7537 afr. Tr.-S.	38,225 E	0,124498825	16,52	} 16,51 %		
	2) 0,5652 lfttr. = 0,5203 Tr.-S. = 0,4930 afr. Tr.-S.						
	3) 0,6982 lfttr. = 0,6428 Tr.-S. = 0,6091 afr. Tr.-S.						
	VI	1) 0,7948 lfttr. = 0,7213 Tr.-S. = 0,6806 afr. Tr.-S.	36,075 F	0,111111		16,33	} 16,31 %
		2) 0,6963 lfttr. = 0,6319 Tr.-S. = 0,5961 afr. Tr.-S.					
		3) 0,6986 lfttr. = 0,6340 Tr.-S. = 0,5981 afr. Tr.-S.					
		4) 0,6872 lfttr. = 0,6236 Tr.-S. = 0,5883 afr. Tr.-S.	31,750 F	0,09779		16,35	
			31,075 F	0,095711		16,30	
VII		1) 0,5618 lfttr. = 0,5076 Tr.-S. = 0,4813 afr. Tr.-S.	24,150 E	0,07865655	16,34	} 16,23 %	
		2) 0,6564 lfttr. = 0,5931 Tr.-S. = 0,5623 afr. Tr.-S.					
		3) 0,5999 lfttr. = 0,5416 Tr.-S. = 0,5135 afr. Tr.-S.					
			27,900 E	0,0908703	16,16		
		25,525 E	0,083134925	16,19			

Belege (Fortsetzung).

Schwefel				
Angew. Fleischsubstanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S g	% S der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 1,0908 lfttr. = 1,0042 Tr.-S. = 0,9498 afr. Tr.-S. 2) 1,1270 lfttr. = 1,0375 Tr.-S. = 0,9831 afr. Tr.-S.	  0,0368   0,0403	  0,00506184   0,055543265	  0,53   0,56	  } 0,55 %  
1) 1,1007 lfttr. = 0,9989 Tr.-S. = 0,9424 afr. Tr.-S. 2) 1,1531 lfttr. = 1,0464 Tr.-S. = 0,9872 afr. Tr.-S.	  0,0417   0,0422	  0,005735835   0,00580461	  0,61   0,59	  } 0,60 %  
1) 0,9681 lfttr. = 0,8748 Tr.-S. = 0,8294 afr. Tr.-S. 2) 0,9951 lfttr. = 0,8992 Tr.-S. = 0,8525 afr. Tr.-S.	  0,0398   0,0405	  0,00547449   0,005570775	  0,66   0,65	  } 0,66 %  

Stickstoff						
Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	entspr. ccm. Lauge	N g	% N der afr. Tr.-S.	Mittel	
VIII	1) 0,6775 lfttr. = 0,6178 Tr.-S. = 0,5846 afr. Tr.-S.	27,750 K	0,0970695	16,60	} 16,58 %	
	2) 0,7807 lfttr. = 0,7119 Tr.-S. = 0,6737 afr. Tr.-S.	31,900 K	0,1115862	16,56		
	3) 0,7191 lfttr. = 0,6557 Tr.-S. = 0,6205 afr. Tr.-S.	29,400 K	0,1028412	16,57		
	1) 0,4928 lfttr. = 0,4464 Tr.-S. = 0,4226 afr. Tr.-S.	21,675 E	0,070595475	16,71		} 16,72 %
	2) 0,5653 lfttr. = 0,5120 Tr.-S. = 0,4847 afr. Tr.-S.	24,875 E	0,081017875	16,72		
	1) 0,6241 lfttr. = 0,5774 Tr.-S. = 0,5454 afr. Tr.-S.	27,925 E	0,090951625	16,68		
	2) 0,5544 lfttr. = 0,5129 Tr.-S. = 0,4844 afr. Tr.-S.	24,825 E	0,080855025	16,69		
	3) 0,5923 lfttr. = 0,5479 Tr.-S. = 0,5175 afr. Tr.-S.	26,675 E	0,086880475	16,79		
	XI	1) 0,7094 lfttr. = 0,6700 Tr.-S. = 0,6339 afr. Tr.-S.	30,225 K	0,10572705		16,68
2) 0,6444 lfttr. = 0,6086 Tr.-S. = 0,5758 afr. Tr.-S.		27,425 K	0,09593265	16,66		
3) 0,6950 lfttr. = 0,6564 Tr.-S. = 0,6210 afr. Tr.-S.		29,550 K	0,1033659	16,64		
4) 0,6822 lfttr. = 0,6443 Tr.-S. = 0,6095 afr. Tr.-S.		29,05 K	0,1016169	16,67		

**Belege (Fortsetzung).**

**Schwefel**

Angew. Fleischsubstanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S g	‰ S der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 1,0732 lfttr. = 0,9787 Tr.-S. = 0,9261 afr. Tr.-S.	0,0479	0,006588645	0,71	} 0,70 ‰
2) 1,0501 lfttr. = 0,9576 Tr.-S. = 0,9062 afr. Tr.-S.	0,0456	0,00627228	0,69	
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
1) 0,9160 lfttr. = 0,8474 Tr.-S. = 0,8004 afr. Tr.-S.	0,0241	0,003314955	0,41	} 0,42 ‰
2) 0,9900 lfttr. = 0,9158 Tr.-S. = 0,8650 afr. Tr.-S.	0,0264	0,00363132	0,42	
1) 1,0076 lfttr. = 0,9517 Tr.-S. = 0,9004 afr. Tr.-S.	0,0309	0,004250295	0,47	} 0,47 ‰
2) 1,0751 lfttr. = 1,0154 Tr.-S. = 0,9606 afr. Tr.-S.	0,0326	0,00448413	0,47	

Stickstoff					
Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	entspr. ccm. Lauge	N g	% N der afr. Tr.-S.	Mittel
XII	1) 0,6954 lfttr. = 0,6414 Tr.-S. = 0,6080 afr. Tr.-S.	28,975 L	0,1009489	16,60	} 16,61 %
	2) 0,7455 lfttr. = 0,6876 Tr.-S. = 0,6518 afr. Tr.-S.				
	3) 0,7282 lfttr. = 0,6717 Tr.-S. = 0,6368 afr. Tr.-S.	31,075 L	0,1082653	16,61	
		30,350 L	0,1057394	16,61	
XIII	1) 0,7025 lfttr. = 0,6382 Tr.-S. = 0,6053 afr.-Tr.-S.	30,425 F	0,093709	15,48	} 15,48 %
	2) 0,6525 lfttr. = 0,5927 Tr.-S. = 0,5621 afr. Tr.-S.				
	3) 0,7026 lfttr. = 0,6382 Tr.-S. = 0,6053 afr. Tr.-S.	28,275 F	0,087087	15,49	
	4) 0,6692 lfttr. = 0,6079 Tr.-S. = 0,5765 afr. Tr.-S.				
		30,400 F	0,093632	15,47	
		28,950 F	0,089166	15,47	
XIV	1) 0,7625 lfttr. = 0,6792 Tr.-S. = 0,6454 afr. Tr.-S.	31,850 F	0,098098	15,20	} 15,24 %
	2) 0,6569 lfttr. = 0,5852 Tr.-S. = 0,5561 afr. Tr.-S.				
	3) 0,5930 lfttr. = 0,5282 Tr.-S. = 0,5019 afr. Tr.-S.	27,575 F	0,084931	15,27	
		24,850 F	0,076538	15,25	

Belege (Fortsetzung).

Schwefel				
Angew. Fleischsubstanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S g	% S der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 1,2947 lfttr. = 1,1942 Tr.-S. = 1,1321 afr. Tr.-S. 2) 1,0212 lfttr. = 0,9420 Tr.-S. = 0,8930 afr. Tr.-S.	0,0416    0,0325	0,00572208    0,004470375	0,50    0,51	} 0,51 %
1) 1,0293 lfttr. = 0,9350 Tr.-S. = 0,8868 afr. Tr.-S. 2) 1,3375 lfttr. = 1,2150 Tr.-S. = 1,1523 afr. Tr.-S.	0,0419    0,0519	0,005763345    0,007138845	0,65    0,62	} 0,64 %
1) 1,1663 lfttr. = 1,0389 Tr.-S. = 0,9873 afr. Tr.-S. 2) 1,2042 lfttr. = 1,0727 Tr.-S. = 1,0194 afr. Tr.-S.	0,0494    0,0505	0,00679497    0,006946275	0,69    0,68	} 0,69 %



Stickstoff					
Fleisch-Nr.	Angew. Fleischsubstanz g	entspr. ccm. Lauge	N g	% N der afr. Tr.-S.	Mittel
XV	1) 0,6927 lfttr. = 0,6224 Tr.-S. = 0,5928 afr. Tr.-S.	29,500 F	0,09086	15,33	} 15,31 %
	2) 0,6634 lfttr. = 0,5961 Tr.-S. = 0,5677 afr. Tr.-S.				
	3) 0,6853 lfttr. = 0,6157 Tr.-S. = 0,5864 afr. Tr.-S.	28,200 F	0,086856	15,30	
	4) 0,7147 lfttr. = 0,6422 Tr.-S. = 0,6116 afr. Tr.-S.				
		29,050 F	0,089474	15,26	
		30,45 F	0,093786	15,34	

Belege (Fortsetzung).

Schwefel				
Angew. Fleischsubstanz g	BaSO <sub>4</sub> g	S g	% S der afr. Tr.-S.	Mittel
1) 1,3206 lfttr. = 1,1866 Tr.-T. = 1,1301 afr. Tr.-S.	0,0466	0,00640983	0,57	} 0,57 ‰
2) 1,2907 lfttr. = 1,1597 Tr.-S. = 1,1045 afr. Tr.-S.	0,0446	0,00613473	0,56	

# Zur Kenntniss der Ehrlich'schen Dimethylamido- benzaldehydreaction.

Von

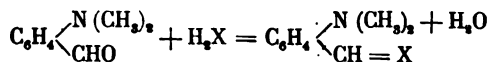
Dr. Pröschner.

Mit einer lithographischen Tafel.

(Aus dem Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M.)

(Der Redaction zugegangen am 2. December 1900.)

Vor etwa zwei Jahren beobachtete Ehrlich, dass normaler Harn bei Zusatz von Dimethylamidobenzaldehyd in saurer Lösung eine schwache Rothfärbung zeigt. Auf Veranlassung von Geh. Rath Ehrlich habe ich versucht, den dieser Reaction zu Grunde liegenden Bestandtheil des Harns zu isoliren. Im Voraus möchte ich mittheilen, dass von den bekannten Bestandtheilen des Urins keiner die Reaction zeigt und der isolirte Körper einen bis jetzt unbekannten Bestandtheil des normalen Harns bildet. Ehe ich zur Beschreibung der Isolirung dieses Körpers übergehe, möchte ich etwas näher auf den Chemismus der Reaction eingehen. Die Reaction mit dem Dimethylamidobenzaldehyd verläuft im Sinne folgender Gleichung:



Die Aldehydgruppe reagirt wahrscheinlich mit einer Methylen- oder Amidogruppe des noch unbekannten Körpers. Zur Ausführung der Reaction bedarf man einer etwa 2%igen salzsauren Lösung von Dimethylamidobenzaldehyd.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Der Dimethylamidobenzaldehyd war von Geigy & Co. in Basel bezogen.

Von dieser Lösung fügt man einige Tropfen dem Urin zu; nach wenigen Secunden färbt sich der Harn je nach der Menge des vorhandenen Körpers schwach oder stark hell kirschroth. Im normalen Urin schwankt die Intensität der Reaction sehr beträchtlich, fehlt aber nur sehr selten. Man kann den rothen Farbstoff sehr leicht mit Di- oder Epichlorhydrin ausziehen; ebenso mit Chloroform, in dem er aber etwas schwerer löslich ist. Als Contrastprobe<sup>1)</sup> kann man auch noch folgenden Versuch anstellen: Man nimmt gleiche Volumina Harn in zwei Reagensgläsern, gibt in das eine einige Tropfen Formaldehyd, schüttelt gut um und füge dann zu beiden Dimethylamidobenzaldehyd zu. Der mit Formaldehyd versetzte Harn behält seine ursprüngliche Farbe, während der andere schön roth gefärbt ist. Durch Zufügen von Formaldehyd ist die Gruppe, die mit dem Aldehydrest reagirt, verstopft worden, kann also mit dem Dimethylamidobenzaldehyd nicht mehr in Action treten. Die Condensation lässt sich mit jedem Aldehyd ausführen, doch eignen sich zur Farbenreaction nur solche Aldehyde, die einen aromatischen Rest und auxochrome Gruppen enthalten, wie dies beim Dimethylamidobenzaldehyd der Fall ist. Auch das Chlorderivat des Dimethylamidobenzaldehyds ist zur Reaction geeignet. Diäthylamidobenzaldehyd zeigt im Vergleich zum Dimethylamidobenzaldehyd eine viel schwächere Rothfärbung.

Zur Isolirung dieses Körpers kommt normaler Harn nicht in Betracht, da die Mengen desselben zu gering sind und viele Hunderte Liter von Harn nothwendig wären, um nur einige Centigramme des Körpers zu erhalten. Durch zahlreiche Untersuchungen pathologischer Harne habe ich gefunden, dass der Urin von Kranken, die an Typhus, Phthise, chronischen Enteritiden leiden, die Reaction in verstärktem Maasse gibt und zur Gewinnung des Körpers sich am besten eignet. Man verarbeite nur Harne, die eine starke rothe Reaction geben. Von der direkten Isolirung des Körpers

---

<sup>1)</sup> Dieser Versuch ist unabhängig von uns von Prof. Nicolaier in Göttingen gefunden worden, wie er uns brieflich mitgetheilt hat.

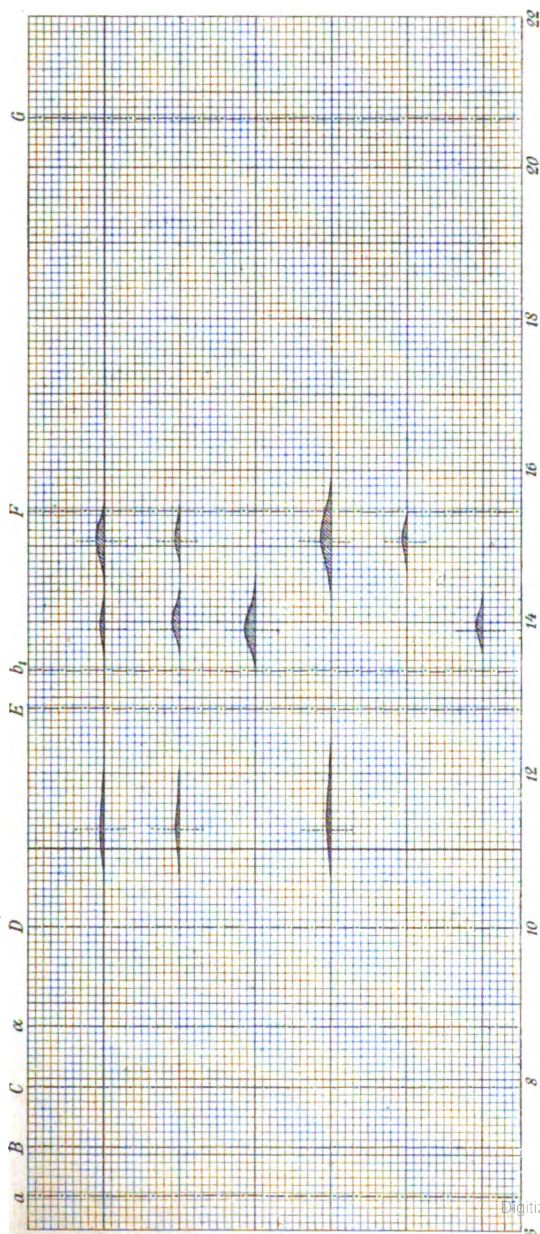
mittel fehlen. Mit Amylalkohol kann man aus dem Harn, nach Sättigung mit Ammonsulfat, denselben theilweise ausschütteln, doch ist diese Methode zur Gewinnung grösserer Quantitäten ungeeignet. Ich habe deshalb versucht, den rothen Farbstoff zu isoliren und den unbekannten Körper vom Dimethylamidobenzaldehyd abzuspalten, sobald grössere Mengen desselben mir zur Verfügung stehen. Der neue Harnbestandtheil kommt selbst in pathologischen Fällen, wo er gegen die Norm bedeutend vermehrt ist, doch immer in sehr geringer Menge vor, so dass zur Gewinnung von ca. 1 g des Farbstoffes ca. 100 Liter Harn, der die Reaction stark geben muss, nothwendig sind.

Zu 3 Liter Harn setzt man 20—30 ccm. Dimethylamidobenzaldehydlösung,<sup>1)</sup> gibt 100 ccm. concentrirte Salzsäure zu, lässt einige Zeit stehen, sättigt die Flüssigkeit mit Ammonsulfat und schüttelt mit Chloroform aus. Das Chloroform wird im Scheidetrichter vom Harn getrennt und ein- bis zweimal mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen. Die beim Schütteln mit Chloroform entstehende Emulsion verarbeitet man am besten folgendermassen :

Nachdem die Chloroformlösung mit gesättigter Ammonsulfatlösung gewaschen und von derselben getrennt ist, gibt man frisches Chloroform zu und schüttelt gut durch. Die vom Chloroform eingeschlossene Flüssigkeit trennt sich dann glatt von derselben und wird im Scheidetrichter abgetrennt. Vollkommen wird der rothe Farbstoff nicht extrahirt, geringe Mengen desselben bleiben noch in der Flüssigkeit zurück. Nachdem die Chloroformauszüge vereinigt, filtrirt man durch ein trockenes Faltenfilter und trocknet die Chloroformlösung mit geschmolzenem Glaubersalz. Nachdem dasselbe getrocknet ist, filtrirt man, wäscht das Glaubersalz mit geringen Mengen Chloroform nach und dunstet dasselbe im Vacuum bei ca. 35—40° ab. Ist die Hauptmenge desselben abge-

---

<sup>1)</sup> Man löst ca. 20 g Dimethylamidobenzaldehyd in 500 ccm. concentrirter Salzsäure und gibt dann 500 ccm destillirtes Wasser zu.



Farbstofflösung I. Phase

" II. Phase

" III. Phase

Farbstofflösung u. Sulfpersäure

" u. Ammoniak

" u. alkoholische Kalklösung

Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, Band XXXI.

Zu Fröscher, Zur Kenntniss der Ehrlichschen Dimethylamidobenzaldehydreaction."

Verlag von Carl J. Neuberger, Leipzig.

Leb. Werner & Neuberger, Frankfurt a. M.



dunstet, so bringt man den Rest desselben in flache Schalen und lässt denselben im Vacuumexsiccator, der mit Paraffin und Schwefelsäure beschickt ist, absorbiren. Die vollkommen trockene, krystallinisch erstarrte Masse, die den rothen Farbstoff einschliesst, und die der Hauptmenge nach aus unverändertem Dimethylamidobenzaldehyd besteht, wird fein zerrieben und mit Ligroin ausgezogen. Nach 3—4maligen Ausziehen mit Ligroin gibt man Toluol oder Benzol zu und extrahirt damit so lange, bis dasselbe beinahe farblos ist. Der Farbstoff hinterbleibt als schmierige, dunkelrothe Masse, die noch geringe Mengen Dimethylamidobenzaldehyd einschliesst. Nachdem das Toluol oder Benzol mit Aether verdrängt ist, löst man den Rückstand in wenig Alkohol, worin er sich mit dunkelkirschrother Farbe leicht löst. Um geringe Mengen Dimethylamidobenzaldehyd, die mit in die alkoholische Lösung übergehen, zu entfernen, wird der rothe Farbstoff ausgefällt. Man stellt sich zunächst ein Gemisch von einem Volumen Ligroin, 2 Volumen Benzol oder Toluol und 2 Volumen Aether her. Diese Mischung gibt man dem in möglichst wenig Alkohol gelösten rothen Farbstoff zu, schüttelt gut durch und lässt zwei bis drei Tage im Dunkeln stehen. Die Hauptmenge des Farbstoffes ist nach zwei Tagen vollkommen ausgefällt und klebt an den Wandungen des Gefässes fest. Man giesst die schwach roth gefärbte Lösung ab, spült mit Aether nach, löst den rothen Farbstoff in absolutem Alkohol, filtrirt und dunstet den Alkohol im Vacuum über Phosphorsäureanhydrid vollkommen ab. Zur vollkommenen Entfernung des Dimethylamidobenzaldehyd fällt man den Farbstoff mit dem Ligroin-Toluol-Aethergemisch zweimal aus. Der Vacuumexsiccator muss dunkel gehalten werden, da der rothe Farbstoff durch das Sonnenlicht leicht zerstört wird. Nach 1—2 Tagen ist der Alkohol verdunstet und haftet der Farbstoff als dünne Haut an dem Glas. Zur leichteren Entfernung desselben von der Glasschale stellt man dieselbe in den Trockenkasten und lässt die Temperatur nicht über 70° steigen. Nach 1—2 Stunden ist die letzte Spur Alkohol verschwunden und man kann mit einem dünnen Glas-





dem theoretisch berechneten Werthe nicht überein. Der Grund für diesen Fehler liegt wohl darin, dass geringe Mengen des Farbstoffes ungelöst blieben und so die Bestimmung zu niedrig ausfiel. Welche Formel kommt nun dem neuen Körper zu? Betrachten wir zunächst den Verlauf der Reaction näher, so finden wir, dass der Dimethylamidobenzaldehyd sich mit dem unbekannten Körper unter Wasseraustritt zu dem rothen Farbstoff vereinigt. Wir brauchen also nur den Rest  $C_9H_{11}N$  (Dimethylamidobenzaldehyd  $-O$ ) von  $C_{16}H_{24}O_6N_2$  abzuziehen und 2 Atome Wasserstoff dazu addiren, um zu der Formel des unbekannten Körpers zu kommen. Die Formel ergibt sich dann zu  $C_7H_{15}O_6N$ . Welche Constitution dem Körper zukommt, darüber lassen sich vorläufig nur Vermuthungen aufstellen. Die Formel  $C_7H_{15}O_6N$  steht der des Glucosamins  $C_6H_{13}O_5N$  am nächsten und unterscheidet sich nur durch einen Mehrgehalt von  $COH_2$  von derselben. Ob der Körper ein Formylglucosamin oder das Acetylderivat des noch unbekannten Pentosamins darstellt, darüber müssen weitere Untersuchungen entscheiden.

Zum Schlusse füge ich noch die spektroskopische Untersuchung des rothen Farbstoffes an, die ich der Güte des Herrn Dr. Formánek in Prag verdanke und dem ich auch an dieser Stelle bestens dafür danke. Herr Dr. Formánek theilte mir darüber Folgendes mit: Als ich die Lösung in die Eprouvette gebracht und vor den Spalt des beleuchteten Spektroskops gestellt habe, so beobachtete ich ein Absorptionsspektrum mit drei Stufen, und zwar auf  $\lambda$  559,  $\lambda$  510 und  $\lambda$  492 (der stärkste Streifen). Es war die erste Phase des Spektrums. Allmählich aber änderte sich das Spektrum von selbst. Die Stufe  $\lambda$  510 wurde stärker und die Stufe  $\lambda$  492 wurde schwächer (II. Phase), bis endlich nach längerem Stehen die Stufen  $\lambda$  559 und  $\lambda$  492 verschwanden, während die Stufe  $\lambda$  510 in verstärktem Maasse stehen blieb (III. Phase). Ich habe die Flasche im Dunkeln aufbewahrt und die Lösung nach einigen Tagen wieder untersucht; der Vorgang war derselbe und das Spektrum änderte sich genau wie im ersten Falle. Ich kann mir diese Erscheinung nur dadurch erklären,

Lichte durch die Eprouvette der Farbstoff sich veränderte und dadurch sein Spektrum. Die Lösung war rosaroth und fluorescirte grün. Als ich diese Lösung mit verdünnter Salpetersäure versetzte (auf 5 ccm. Farbstofflösung 3 Tropfen Salpetersäure 1 : 3), so wurde die Farbe intensiver und die Fluorescens verschwand. Im Spektrum zeigten sich 2 starke Absorptionsstreifen auf  $\lambda$  559 und  $\lambda$  492. Nach Zusatz von verdünntem Ammoniak (specifisches Gewicht 0,96, 1 : 5), und zwar auf 5 ccm. Farbstofflösung 3 Tropfen Ammoniak, wurde die Flüssigkeit orangegelb und im Spektrum zeigte sich ein schwacher Streifen auf 592,7.

Nach Zusatz von alkoholischer Kalilauge (1 : 10) wurde die Flüssigkeit gelb und es zeigte sich im Spektrum eine Stufe auf  $\lambda$  492.

In der Zeichnung  $\lambda$  559 = 11,25 der Millimeterskala

»	»	«	$\lambda$ 510 = 13,90	»	»
»	»	»	$\lambda$ 492 = 15,05	»	»

---

## Ueber das Jodprodukt des Oxyhämoglobins.

Von

Privatdocent Dr. D. Kurajeff.

---

(Aus dem physiol.-chemisch. Laboratorium von Prof. A. Danilewsky zu St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 4. December 1900.)

---

Das Studium der Jodirungsprodukte verschiedener Eiweissstoffe bietet, wie aus Untersuchungen mehrerer Autoren hervorgeht, ein Interesse in mehrfacher Hinsicht, insbesondere für die chemische Charakterisirung verschiedener Eiweissformen, da ja der Unterschied in der Jodaufnahmefähigkeit der einzelnen Eiweisskörper in direkter Abhängigkeit von ihrer chemischen Zusammensetzung stehen muss. Besonderes Interesse in dieser Hinsicht haben selbstverständlich Jodprodukte gut individualisirter d. h. krystallisirter Eiweisskörper. Prof F. Hofmeister<sup>1)</sup> hat als erster das Jodprodukt des krystallisirten Eialbumins dargestellt und analysirt; dann studirte ich<sup>2)</sup> näher in seinem Laboratorium die Bedingungen der Jodirung krystallisirter Eiweissstoffe und beschrieb das Jodprodukt des krystallisirten Serumalbumins.

Es blieb also noch, das Jodprodukt des dritten krystallisirenden Eiweisskörpers, nämlich des Oxyhämoglobins, darzustellen.

Nachdem F. Blum und W. Vaubel<sup>3)</sup> und ich, unabhängig von einander, gezeigt hatten, dass die Jodirung der Eiweissstoffe auch bei neutraler oder schwach alkalischer

---

1) F. Hofmeister, Zeitschr. f. phys. Chemie. Bd. XXIV, S. 159, 1898.

2) D. Kurajeff, ibidem, Bd. 26, S. 462, 1899.

3) F. Blum u. W. Vaubel, Journal f. prakt. Chemie, N. F. Bd. 57, S. 365, 1898.

Oxyhämoglobin bei für das Intactbleiben seines Moleküls günstigen Bedingungen der Jodirung zu unterwerfen. In der Litteratur, soviel ich weiss, gibt es nur einen Versuch von F. J. Hopkins und S. N. Pinkus,<sup>1)</sup> das Oxyhämoglobin des Hundes zu bromiren. Bei der Bromirung des Hundeoxyhämoglobins haben die Autoren einen flockigen braunen Niederschlag erhalten, der sich sogar in kaltem Alkohol leicht löste und aus alkoholischer Lösung durch Aether ausgefällt werden konnte. Im Filtrat vom Bromprodukt des Oxyhämoglobins haben die Verfasser das Vorhandensein von  $\text{BrFe}$  constatirt, der Niederschlag selbst aber enthielt 0,33—0,41% Fe d. h. eine Eisenmenge, die dem Eisengehalt des Hundeoxyhämoglobins selbst sehr nahe steht.

Ich machte auch einen Versuch, das Pferdeoxyhämoglobin zu jodiren, und analysirte das erhaltene Jodprodukt des Oxyhämoglobins, das ich der Kürze wegen «Jodhämoglobin» nennen werde.

## II.

### *Darstellung des Jodhämoglobins.*

Das krystallisirte Pferdeoxyhämoglobin wurde im Allgemeinen nach der Hoppe-Seyler'schen Methode dargestellt; im Einzelnen folgte ich der Beschreibung des Darstellungsverfahrens, die in der Arbeit von D. Lawrow<sup>2)</sup> angeführt worden ist. Die zuerst erhaltenen Krystalle von Oxyhämoglobin wurden noch zweimal umkrystallisirt. Das von mir angewandte krystallinische Oxyhämoglobin besass alle typischen Eigenschaften. Für die Jodirung des Oxyhämoglobins benutzte ich in einigen Versuchen die Blum-Vaubel'sche Methode, d. h. ich liess Jod in KJ-Lösung in Ueberschuss auf die wässrige Lösung von Oxyhämoglobin bei Anwesenheit von überschüssigem Natriumbicarbonat reagiren; die Reaction der Flüssigkeit wurde durch Hinzufügen von Natriumbicarbonat

---

<sup>1)</sup> F. J. Hopkins u. S. N. Pinkus, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 31, S. 1311, 1898.

<sup>2)</sup> D. Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 343, 1898.

immer schwach alkalisch erhalten. In anderen Versuchen benutzte ich diejenige Jodirungsmethode, welche ich in meiner früheren Arbeit hauptsächlich angewandt hatte, nämlich, ich verwandte einen Ueberschuss von Jod in Jodkaliumlösung in Gegenwart von einer bestimmten Menge  $\text{KJO}_3$ . Um alle Bedingungen, die auf das Intactbleiben des Oxyhämoglobins schädlich einwirken können, zu beseitigen, führte ich die Jodirung bei Zimmertemperatur im Laufe von mehreren Tagen aus.

Bei der Jodirung des Oxyhämoglobins erschien sehr bald (in einigen Minuten) ein flockiger schwarzbrauner Niederschlag, der sich bald auf dem Boden des Gefässes sammelte. Nach einigen Tagen wurde die über den Niederschlag stehende Flüssigkeit nur schwach gelbgrünlich gefärbt und zeigte kein bestimmtes Spectrum (etwa des Oxyhämoglobins oder des Hämatins). Das Filtrat vom Niederschlag beim Hinzufügen vom gleichen Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gab entweder nur eine minimale Trübung, oder aber Anfangs sogar keine Trübung; nur bei langdauerndem Stehen der Probe erschien eine kleine Menge von zarten, braunen Flöckchen. Der abfiltrirte Niederschlag des Jodprodukts des Oxyhämoglobins wurde zur Beseitigung von überschüssigem JK und J zuerst gut mit Wasser gewaschen. Da der Niederschlag sich in verdünntem Ammoniak als fast unlöslich erwies, löste ich ihn behufs weiterer Reinigung von beigemischtem J und JH in verdünnter  $\text{NaHO}$  (1—3%). Man muss bemerken, dass Niederschläge, welche nach der Blum-Vaubel'schen Methode dargestellt wurden, sich sogar in 3%iger  $\text{NaHO}$  nur mit grosser Schwierigkeit lösten und zur Auflösung bei Zimmertemperatur 2—3 Tage forderten. Die nach der Methode mit  $\text{KJO}_3$  erhaltenen Niederschläge lösten sich dagegen viel leichter, als die ersten, sogar in 1—2%iger  $\text{NaHO}$ . Die alkalischen Lösungen der Niederschläge wurden sogleich mit einem kleinen Ueberschuss von Essigsäure gefällt; die erhaltenen Niederschläge wurden mit Wasser, Alkohol und Aether bis zum völligen Verschwinden der Jodreaction sorgfältig gewaschen. In einem Falle löste ich den nach der Blum-Vaubel'schen

hydrat, sondern wusch ihn nur mit Wasser, Alkohol und Aether durch, bis die Waschflüssigkeiten keine Jodreaction mehr gaben. Die Darstellung und Analyse des auf diese Weise erhaltenen Niederschlages war von Bedeutung wegen des Vergleichs mit anderen mit Alkali behandelten Präparaten von Jodhämoglobin. Die gleiche Darstellungsweise (ohne Alkali) führte bei einem nach der Methode mit  $\text{KJO}_3$  dargestellten Präparat von Jodhämoglobin nicht zum Ziele, weil die Waschflüssigkeiten ungeachtet des sorgfältigen und sehr langdauernden Auswaschens mit Wasser, Alkohol und Aether immer merkliche Spuren von freiem Jod (resp. JH) enthielten.

Deshalb beschränkte ich mich auf die Analyse nur des oben erwähnten Präparats 3.

Die Präparate von Jodhämoglobin, deren Reinigung mittelst Alkali ausgeführt wurde, gaben zuerst keine Jodreaction beim Schütteln mit verdünnter Schwefelsäure bei Anwesenheit von  $\text{KNO}_3$  und Chloroform; nur nach langem Stehen erschienen Spuren von Jodreaction. Das nicht mit Alkali bearbeitete Präparat zeigte unter den erwähnten Bedingungen ziemlich bald eine Jodreaction, d. h. es erschien eine schwache Rothviolettfröbung des Chloroforms.

Um eine Vorstellung von dem Verhalten des Hämatins zur Jodirung zu bekommen, machte ich in dieser Richtung einen Versuch. Das Hämatin wurde von mir aus dem nach Schalfefeff<sup>1)</sup> erhaltenen krystallisirten Hämin dargestellt. Obgleich dieser Versuch, wie es aus den weiter angeführten Analysen hervorgeht, nicht gelungen ist, will ich ihn nichtdestoweniger im Folgenden zusammen mit der ausführlichen Schilderung des Darstellungsverfahrens der drei von mir zur Analyse angewandten Präparate von Jodhämoglobin beschreiben.

#### Präparat 1.

Zur Lösung von ca. 50 g rohem Oxyhämoglobin in  $1\frac{1}{2}$  l Wasser wurde nach und nach 20 g J, 30 g KJ und

<sup>1)</sup> Schalfefeff, Journ. d. russ. phys.-chem. Gesellsch. Bd. 17, S. 36, 1885.

$\text{NaHCO}_3$  in Ueberschuss zugesetzt; die Reaction wurde immer schwach alkalisch erhalten. Die Mischung blieb 16 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Schon nach einigen Minuten bildete sich in der Flüssigkeit ein flockiger schwarzbrauner Niederschlag. Die Flüssigkeit wurde häufig umgerührt. Nach 16 Tagen wurde der Niederschlag abfiltrirt; das schwach grünlichgelb gefärbte Filtrat enthielt einen Ueberschuss von freiem Jod, gab kein bestimmtes Spectrum, mit gesättigter Lösung von Ammonsulfat (mehr als das gleiche Volumen) gab es nur eine minimale Trübung, die sich nach langem Stehen in zarte braune Flöckchen verwandelte. Der mit Wasser ausgewaschene Niederschlag wurde mit Schwierigkeit im Laufe von 3 Tagen in 3%  $\text{NaHO}$  gelöst. Beim Lösen des Niederschlages entwickelte sich eine nicht unbedeutende Menge von Glasbläschen, die feuchtes rothes Lakmuspapier blau färbten. Die erhaltene braunrothe alkalische Lösung des Niederschlages wurde abfiltrirt und mit kleinem Ueberschuss von Essigsäure ausgefüllt. Der Niederschlag wurde abfiltrirt, das Filtrat war nur schwach grünlichgelb gefärbt und enthielt nur Spuren von Eiweiss (Probe mit  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ ). Der Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Aether so lange gewaschen, bis die Reaction auf Jod (resp.  $\text{JH}$ ) vollständig verschwunden war.

#### Präparat 2.

Verwendet wurden ca. 50 g rohes Oxyhämoglobin, 15 J g, 30 g JK, 2 g KJO<sub>3</sub> und ca.  $1\frac{1}{2}$  Liter Wasser. Die Mischung stand bei Zimmertemperatur 18 Tage. Darauf wurde der gebildete Niederschlag abfiltrirt; das schwach grünlichgelb gefärbte Filtrat enthielt einen grossen Jodüberschuss, zeigte keine Absorptionsstreifen; bei Zusatz von etwa gleichem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung entstand zuerst keine Trübung; erst nach einem Tage bildeten sich zarte braune Flöckchen. Der Niederschlag wurde mit Wasser ausgewaschen, in 1%igem Natronhydrat gelöst und die Lösung nach  $1\frac{1}{2}$  Tagen abfiltrirt. Die Lösung dieses Niederschlages in Alkali ging viel leichter vor sich, als diejenige des Niederschlages 1. Die



von Essigsäure gefällt; der gebildete Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen.

### Präparat 3.

Verwendet wurden ca. 25,0 feuchtes Oxyhämoglobin, 600 ccm. Wasser, 7,0 J, 14,0 KJ und Natriumbicarbonat in Ueberschuss. Der Niederschlag bildete sich bei Zusatz von Jod fast sogleich. Die Mischung blieb bei Zimmertemperatur 14 Tage stehen. Der Niederschlag wurde abfiltrirt und mit Wasser, Alkohol und Aether so lange gewaschen, bis keine Reaction auf Jod (resp. JH) mehr auftrat. Verdünnte Schwefelsäure, die mit dem schon ausgewaschenen Niederschlage während 15 Minuten durchgeschüttelt und sodann abfiltrirt wurde, gab keine Reaction auf Jod mit  $\text{KNO}_3$  und Chloroform. Wenn man aber diese Reaction bei Anwesenheit des Niederschlages ausführt, so tritt ziemlich bald eine schwache roth-violette Färbung des Chloroforms auf.

Jodirung des Hämatins. Eine kleine Menge (ca. 3,0) von krystallisirtem Hämin wurde nach Schalfjeff dargestellt. Das mit Wasser sorgfältig ausgewaschene krystallinische Hämin wurde in 1%iger NaHO gelöst, die Lösung wurde abfiltrirt und mit 2%iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gefällt. Der Niederschlag von Hämatin wurde mit Wasser ausgewaschen und in ca. 400 ccm.  $\text{NaHCO}_3$  gelöst, zur Lösung wurde nach und nach 3,0 Jod und 6,0 KJ zugesetzt. Die ersten 6 Stunden stand die Mischung bei 45—50° C. und darauf eine Nacht bei 38° C. In der Flüssigkeit war kein Niederschlag, beim Ansäuern mit Essigsäure schied sich ein flockiger braunschwarzer Niederschlag aus; der Niederschlag wurde abfiltrirt (im Filtrat Ueberschuss von Jod), mit Wasser ausgewaschen, dann in 1%iger NaHO gelöst und mit Essigsäure gefällt. Der ausgefällte Niederschlag wurde mit Wasser, Alkohol und Aether so lange ausgewaschen, bis die Waschflüssigkeiten keine Jodreaction mehr zeigten. Der Alkohol löst merkliche Mengen des Niederschlages auf. Das lufttrockene Jodprodukt des Hämatins besass folgende Eigenschaften. Es löst sich sehr leicht in allen Alkalien. Die

alkalische Lösung des Jodprodukts des Hämatins zeigt den für Hämatin typischen breiten Absorptionsstreifen zwischen C und D (näher an D).

Der mit Schwefelsäure etwas angesäuerte Alkohol löst auch das Jodprodukt des Hämatins und zeigt das charakteristische Spectrum für saure Lösungen von Hämatin. Kalk und Baryhydrat geben gefärbte Niederschläge in alkalischen Lösungen von Jodprodukt des Hämatins; verdünnte Säuren, wie z. B. 0,5%ige Salzsäure, lösen es gar nicht. Gesättigte Lösungen von Ammonsulfat geben mit alkalischen nicht zu starken (noch durchsichtigen) Lösungen des Jodprodukts des Hämatins einen flockigen Niederschlag, nur wenn sie in gleichem Volumen zugesetzt werden.

### III.

#### *Eigenschaften des Jodhämoglobins.*

Beim Trocknen an der Luft wandelt sich das ausgewaschene Jodhämoglobin in eine sehr feste Masse mit glänzendem, fast schwarzem Bruche um. Fein zerrieben stellt sich das Jodhämoglobin als braunschwarzes Pulver dar. Die mit Natronhydrat nicht gereinigten Präparate von Jodhämoglobin lösen sich ziemlich schwer sogar in 3—5%iger NaHO; in verdünntem Ammoniak lösen sich nur Spuren von Substanz, in Soda und Natriumbicarbonat lösen sich solche Präparate von Jodhämoglobin fast gar nicht.

Verdünnte Säuren sogar bei langdauernder Einwirkung lösen nur Spuren von mit Alkali nicht gereinigtem Jodhämoglobin. Alkohol beim Schütteln mit Jodhämoglobin nimmt nur Spuren einer gelbgrünlichen Färbung an, mit Schwefelsäure angesäuert aber färbt sich der Alkohol mehr oder weniger scharf. Die braunrothen alkalischen Lösungen von Jodhämoglobin zeigen, wie es scheint, dasselbe Spectrum, wie diejenigen von Hämatin. Alkalische Lösungen von Jodhämoglobin geben mit  $\text{Ca}(\text{HO})_2$  keinen Niederschlag, mit  $\text{Ba}(\text{HO})_2$  aber geben sie eine Fällung, die alle Eigenschaften des Jodhämoglobins selbst haben. Die mit Natronhydrat bearbeiteten nicht zu trockenen Präparate von Jodhämoglobin

NaHO) und auch in verdünnter (0,5%) Salzsäure. Das Spectrum der sauren Lösungen von Jodhämoglobin scheint mit demjenigen der sauren Lösung von Hämatin und Methämoglobin (der scharfe Absorptionsstreifen zwischen C und D näher an C) identisch zu sein. Alkalische Lösungen von Jodhämoglobin, sowohl die gesättigten, als auch die verdünnten, werden sehr bald und quantitativ durch Zusatz von weniger als dem halben Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt; das Filtrat vom schwarzbraunen Niederschlag ist ganz farblos und enthält kein Jodhämoglobin.

Sorgfältig angestellte vergleichende Versuche über die Ammonsulfatfällung von alkalischen Lösungen von Jodhämoglobin, vom Jodprodukt des Hämatins und auch des Hämatins selbst, gesondert von einander und in bestimmten Mischungen, haben gezeigt, dass die Präparate von Jodhämoglobin kein freies beigemischtes Hämatin oder sein Jodprodukt enthalten. Bei den Bedingungen der Fällung mit Ammonsulfat, bei welchen das Jodhämoglobin ziemlich rasch und vollständig ausgefällt wird, scheidet sich das Jodprodukt des Hämatins aus der sogar viel stärker gefärbten Lösung, als die Lösung von Jodhämoglobin, lange Zeit gar nicht ab. Desgleichen bleibt das Jodprodukt des Hämatins, mit dem Jodhämoglobin gemischt, bei Zusatz von bestimmtem Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung fast vollständig in Lösung, während das Jodhämoglobin schon total ausgefällt ist. Ganz gleich, wie das Jodprodukt des Hämatins, verhält sich auch das Hämatin selbst bei den besprochenen Bedingungen.

#### IV.

*Verhalten des Jodhämoglobins zur Pepsin- und Trypsinverdauung.*

##### a) Einwirkung der Pepsinsalzsäure auf das Jodhämoglobin.

Den 12. October 1900. Ca. 2,0 Jodhämoglobin Präp. 1 wurden mit 100 ccm. 0,5%iger ClH gemischt und die Mischung in den Thermostat bei 37—40° C. gestellt. Nach einigen Stunden trat schon eine merkliche Lösung des Niederschlages

ein. Dann wurde der Flüssigkeit eine kleine Menge Pepsin Grübler zugesetzt.

Den 13. October. Nach der Nacht ging der Niederschlag vollständig in ganz klare, braunrothe Lösung über. Das Spectrum der Flüssigkeit: scharfer Absorptionsstreifen im Roth und diffuse Verdunkelung in anderen Theilen. Die Flüssigkeit gibt starke Jodreaction mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KNO}_3$  und Chloroform.

Den 14. October. In der Flüssigkeit bildete sich ein feiner braunschwarzer Niederschlag. Bei Neutralisation der Flüssigkeit schied sich ein schwarzbrauner Niederschlag aus, der sich bei weiterem Ansäuern mit Essigsäure, oder noch besser mit Salzsäure, wieder vollständig löste. Der Neutralisationsniederschlag besitzt alle Eigenschaften des Jodhäoglobins. Das Filtrat vom Niederschlag ist rothbraun gefärbt und gibt mit Ammonsulfat einen braunen Niederschlag.

Den 19. October. Die Flüssigkeit wurde abfiltrirt; auf dem Filter blieb eine kleine Menge von sehr feinem braunschwarzen Niederschlage. Die Untersuchung dieses Niederschlages zeigte, dass er die Eigenschaften des Hämatins besitzt und grosse Quantität von Fe und J enthält. Das Filtrat vom Niederschlag wurde bis nahezu saurer Reaction neutralisirt, dabei bildete sich ein flockiger, schwarzbrauner Niederschlag, der im Allgemeinen alle Eigenschaften des Jodhäoglobins zeigte. Das Filtrat vom Neutralisationsniederschlag war braun gefärbt, zeigte einen Absorptionsstreifen im Roth und enthielt, wie das sich aus weiteren Untersuchungen herausstellte, eine Mischung von verschiedenen Albumosen mit den Resten vom nicht völlig ausgefallten Jodhäoglobin, Hämatin (resp. seinem Jodprodukt) u. A. Gleich dem Präparat 1 verhält sich zur Pepsinverdauung Präp. 3 und 2; nur löst sich das Präparat 2 viel leichter, schon direkt in 0,5%iger  $\text{ClH}$  ohne das Pepsin. Die Lösung des Präparats 2 in 0,5%iger  $\text{ClH}$  ist ganz klar und braunroth gefärbt und gibt keine Trübung während geraumer Zeit (mehr als ein Monat). Die Jodreaction (resp. JH) erscheint schon nach einem Tage nach dem Lösen des Präparats in 0,5%iger  $\text{ClH}$ , während die Jodabspaltung bei Anwesenheit von Pepsin viel früher geschieht. Bei Neutra-

brauner Niederschlag, der sich beim weiteren Ansäuern sogar mit Essigsäure wieder löst; bei Zusatz von  $\frac{1}{3}$  Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung zur sauren Lösung von Jodhämoglobin bildet sich ein brauner flockiger Niederschlag und das Filtrat erscheint ganz farblos. Der Vergleichung wegen wurde noch ein Versuch mit Pepsin-Verdauung der rothen Blutkörperchen gemacht (zur Zeit hatte ich leider kein reines Oxyhämoglobin). In der Flüssigkeit bildete sich schon in einigen Stunden der Verdauung ein voluminöser braunschwarzer Niederschlag. Nach einigen Tagen wurde der Niederschlag abfiltrirt und erwies sich als Hämatin. Das Filtrat wurde nur schwach gelbgrünlich gefärbt und zeigte kein bestimmtes Spectrum. Nach neun Tagen der Verdauung wurde das Filtrat vom Niederschlag schon sehr scharf braunroth gefärbt, während sein Spectrum nur Spuren von Hämatin zeigte.

Die Lösung des reinen Hämatins, die viel schwächer als das genannte Filtrat gefärbt ist, zeigt scharf das spezifische Spectrum. Man muss denken, dass das Hämatin bei peptischer Verdauung theilweise verändert wird und in saure Lösung übergeht. Dasselbe gilt wahrscheinlich auch für das Jodprodukt des Hämatins, das sich bei peptischer Verdauung des Jodhämoglobins absplattet.

#### b) Trypsinverdauung des Jodhämoglobins.

2,0 Jodhämoglobin Präp. 1 wurden mit 100 ccm. 0,5%igem  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  gemischt, zur Mischung wurde eine kleine Menge von Trypsin Grubler zugesetzt. Das Lösen geschah ziemlich bald; die Flüssigkeit ist braunroth gefärbt, nicht unbedeutende Ammoniakentwicklung, scharfe Reaction auf Jod (resp. JH). Nach zwölfstündigem Stehen im Thermostat bei  $37-40^\circ \text{C}$ . blieb die Lösung klar. Bei Neutralisation der Flüssigkeit mit Salzsäure bildete sich ein flockiger schwarzbrauner Niederschlag nur bei deutlich saurer Reaction. Es ist auffallend, dass der Niederschlag bei weiterem Zusatz von verdünnter Salzsäure vollständig in Lösung übergang, beim Hinzufügen aber von Essigsäure geschah kein vollständiges Lösen des Niederschlages. Wenn man zur alkalischen Lösung vom Neutralisationsnieder-

schlag auf ein Mal eine grosse Menge von starker Salzsäure hinzufügt, so bildet sich ein feiner Niederschlag, der in der Säure unlöslich ist. Dasselbe Verhalten beobachtete ich auch für den Neutralisationsniederschlag aus pepsinsalzsaurer Lösung von Jodhämoglobin. Der durch wiederholtes Lösen in Alkali und Ausfällen mit Säure gereinigte Neutralisationsniederschlag erwies sich als eisen- und jodhaltig. Das Filtrat vom Neutralisationsniederschlag war braunroth gefärbt und enthielt ein Gemisch von Albumosen und Farbstoffen. Ebenso verhält sich zur Trypsinverdauung auch das Präparat 3. Was das Verhalten der rothen Blutkörperchen zur Trypsinverdauung anbetrifft, so fällt nach mehrtägiger Verdauung beim Ansäuern der alkalischen Flüssigkeit ein braunschwarzer Niederschlag von Hämatin aus, das Filtrat ist nur schwach gefärbt und zeigt kein deutliches Spectrum.

V.

*Elementare Zusammensetzung des Jodhämoglobins.*

Die Präparate von Jodhämoglobin und das Jodprodukt des Hämatins trocknete ich zuerst im Trockenschrank bei 100° C. darauf wurde die Temperatur auf 115—125° C. erhöht. Nichtsdestoweniger konnte ich die Präparate während langer Zeit bis zum constanten Gewicht nicht austrocknen. Die Präparate zeigten immer einen kleinen Gewichtsverlust.

Da man durch langdauerndes Trocknen bei hoher Temperatur etwa wesentliche Veränderungen des Jodhämoglobins erwarten konnte, so entschloss ich mich, für Elementaranalysen andere Präparate von Jodhämoglobin zu benutzen, die bis zur Gewichtsconstanz im Vacuumexsiccator ausgetrocknet waren.

Das Präparat vom Jodprodukt des Hämatins, das ich analysirt habe, wurde von mir lange Zeit bei 115—125° C. getrocknet, zeigte immer einen merklichen Gewichtsverlust. Die Jodbestimmungen wurden von mir nach der Volhard'schen Methode ausgeführt, der Stickstoff wurde nach Kjeldahl-Wilfahrt bestimmt, die Bestimmung des Kohlenstoffes und Wasserstoffes geschah durch Verbrennung im offenen Rohre mit Bleichromat, Kupferoxyd und vorgelegter reducirter Kupferspirale im Luft- und Sauerstoffstrome.



Soda-Salpetergemisch bestimmt. Für Eisenbestimmung wurde die Substanz auch mit Soda-Salpetergemisch, das ganz eisenfrei war, geschmolzen: die Schmelze wurde im Wasser, zu dem ein wenig Ammoniak zugesetzt wurde, gelöst. Nach einer Nacht wurde der Eisenoxyniederschlag durch aschenfreies Filter abfiltrirt, ausgetrocknet und verbrannt; die Asche wurde beim Erwärmen mit Salzsäure extrahirt, die saure Eisenchloridlösung wurde mit Ammoniak gefällt u. s. w. Die Analysen gaben folgendes Resultat:

#### Präparat 1.

1.	0,3892	gaben	0,047 498 J	=	12,20 % J
2.	0,3412	„	0,042 799 J	=	12,54 % J
3.	0,2490	„	0,036 146 N	=	14,51 % N
4.	0,4386	„	0,063 407 N	=	14,45 % N
5.	0,2436	„	0,4246 CO <sub>2</sub>	=	47,53 % C
			0,1454 H <sub>2</sub> O	=	6,63 % H
6.	0,2396	„	0,4186 CO <sub>2</sub>	=	47,64 % C
			0,1416 H <sub>2</sub> O	=	6,56 % H

#### Präparat 2.

1.	0,4094	gaben	0,045 974 J	=	11,23 % J
2.	0,3970	„	0,044 196 J	=	11,13 % J
3.	0,3056	„	0,045 311 N	=	14,82 % N
4.	0,2446	„	0,036 146 N	=	14,77 % N
5.	0,2270	„	0,4034 CO <sub>2</sub>	=	48,46 % C
			0,1450 H <sub>2</sub> O	=	7,09 % H
6.	0,2030	„	0,3590 CO <sub>2</sub>	=	48,23 % C
			0,1298 H <sub>2</sub> O	=	7,10 % H
7.	0,7585	„	0,0242 BaSO <sub>4</sub>	=	0,44 % S
8.	1,5976	„	0,0084 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	=	0,37 % Fe

#### Präparat 3.

1.	0,3700	gaben	0,040 767 J	=	11,02 % J
2.	0,5716	„	0,062 992 J	=	11,02 % J
3.	0,2024	„	0,030 031 N	=	14,83 % N
4.	0,3008	„	0,044 500 N	=	14,79 % N
5.	0,3038	„	0,5392 CO <sub>2</sub>	=	48,40 % C
			0,1670 H <sub>2</sub> O	=	6,11 % H
6.	0,1880	„	0,3348 CO <sub>2</sub>	=	48,57 % C
			0,1010 H <sub>2</sub> O	=	5,97 % H
7.	0,6478	„	0,0230 BaSO <sub>4</sub>	=	0,49 % S
8.	1,7322	„	0,0076 Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	=	0,31 % Fe

Jodprodukt des Hämatins.

1. 0,2936 gaben 0,042 037 J = 14,31% J
2. 0,2546 „ 0,032 940 N = 12,93% N
3. 0,1158 „ 0,0202<sup>1)</sup>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> = 12,21% Fe

Präp.	1.			2.			3.			Jod- produkt des Hämatins.
		Mittel		Mittel			Mittel			
C	47,53; 47,64	47,58	48,46; 48,23	48,34	48,40; 48,57	48,48				
H	6,63; 6,56	6,59	7,09; 7,10	7,09	6,11; 5,97	6,04				
J	12,20; 12,54	12,37	11,23; 11,13	11,18	11,02; 11,02	11,02				14,31
N	14,51; 14,45	14,48	14,82; 14,77	14,79	14,83; 14,79	14,81				12,93
S			0,44	0,44	0,49	0,49				
Fe			0,37	0,37	0,31	0,31				12,21

VI.

*Discussion der Resultate.*

Das von mir erhaltene Jodprodukt des Pferdeoxyhämoglobins stellt eine Substanz dar, die sich vom Oxyhämoglobin selbst schon durch seine schwere Löslichkeit sogar in 1—5%igem Natronhydrat sehr scharf unterscheidet. Das Jodprodukt des Oxyhämoglobins fällt bald und, wie es scheint, vollständig sogar bei alkalischer Reaction der Flüssigkeit aus: im Filtrat findet sich nur eine ganz unbedeutende Menge eines Eiweisskörpers. Vor Allem ist von Bedeutung, klar zu stellen, ob nicht das ausgefällte Jodprodukt ein Gemisch von jodirtem Eiweiss (Globin) mit dem Hämatin darstellt. Der von mir angestellte specielle Jodirungsversuch mit reinem Hämatin zeigt, dass das Jodprodukt des Hämatins bei alkalischer Reaction der Flüssigkeit sehr leicht löslich ist und bei der Jodirung nicht ausfällt. Weiter ist das Filtrat vom Jodprodukt des Oxyhämoglobins nur schwach gelbgrünlich gefärbt und zeigt kein bestimmtes Spectrum. Ausserdem zeigen die Versuche mit fractionirter Fällung durch Ammonsulfat des Jodhämoglobins und des Jodproduktes des Hämatins, gesondert von einander und gemischt, dass das Jodhämoglobin kein bei-

1) Die Eisenoxydmenge wurde durch direkte Verbrennung bestimmt.



bicarbonatlösung gar nicht bei langdauerndem Schütteln mit dem Jodhämoglobin. Zuletzt spricht auch die Thatsache des leichten und vollständigen Lösens in 0,5%igem ClH der mit Alkali bearbeiteten Präparate des Jodhämoglobins (Präp. 1 u. 2) dafür, dass das Jodprodukt des Oxyhämoglobins keine Beimischung von Hämatin enthält; dasselbe zeigen auch die Versuche mit Pepsinverdauung des Jodhämoglobins. Also, auf Grund der angeführten Thatsachen muss man mit grosser Wahrscheinlichkeit schliessen, dass die Hämingruppe des Hämoglobins bei Jodirung desselben keine Abspaltung von seinem Eiweissantheil (Globin) erfährt und das erhaltene Jodprodukt eine einheitliche Substanz darstellt.

Der Gehalt des Jods und anderer Elemente in den Präparaten von Jodhämoglobin 2 und 3, die nach verschiedenen Methoden dargestellt und auf verschiedene Weise bearbeitet wurden, ist fast derselbe. Nur unterscheidet sich merklich das Präparat 1 nach seiner Zusammensetzung von anderen Präparaten. Dieser Unterschied in der Zusammensetzung kann ganz gut durch die Alkalieinwirkung (3% NaHO) erklärt werden, weil ich schon früher notirt habe, dass das Präparat 1 sich sehr schwierig und nur nach langer Zeit (3 Tage) vollständig in Alkali löste; dabei wurde auch eine nicht unbedeutende Ammoniakentwicklung constatirt. Das Präparat 2 wurde dagegen verhältnissmässig leicht in verdünnterem Alkali (1—2% NaHO) gelöst.

Diese Alkalibehandlung hat, wie man aus den Analysenzahlen sieht, im Präparat 2 keine wesentlichen Veränderungen der elementaren Zusammensetzung desselben im Vergleich mit derjenigen des Präparats 3, das mit Alkali nicht bearbeitet wurde, erzeugt. Die Analysenergebnisse zeigen also die Constanz und grosse Aehnlichkeit der Zusammensetzung der von mir erhaltenen Präparate von Jodhämoglobin. Die Beziehung des Jodhämoglobins zur Muttersubstanz, d. h. zum Oxyhämoglobin, bietet ein Interesse. Da bis jetzt die elementare Zusammensetzung und die Formel des Pferdeoxyhämoglobins noch nicht festgestellt ist, so muss man zur Beurtheilung der

Beziehung des Jodprodukts zum Oxyhämoglobin hauptsächlich nur das Verhältniss C : N in beiden benutzen.

Im Oxyhämoglobin (von F. Schulz) <sup>1)</sup>	C : N = 3,673
„ Jodhämoglobin Präp. 3	C : N = 3,819
„ „ Präp. 2	C : N = 3,813
„ „ Präp. 1	C : N = 3,833
„ Globin (von F. Schulz)	C : N = 3,797

Daraus sieht man, dass das Verhältniss C : N in den von mir erhaltenen Jodprodukten des Oxyhämoglobins im Vergleich mit demjenigen im Oxyhämoglobin selbst merklich verändert ist. Auffallender Weise ist das Verhältniss C : N im Jodhämoglobin sehr nahe zu demjenigen im Globin von F. Schulz. Der Unterschied zwischen beiden Verhältnissen muss durch das Vorhandensein der Hämatin-Gruppe im Jodhämoglobin bedingt werden.

Auf Grund der angeführten Thatfachen muss man schliessen, dass das von mir erhaltene Jodhämoglobin das Jodprodukt keines ganzen Moleküls des Oxyhämoglobins darstellt. Man muss annehmen, dass sich beim Jodiren des Oxyhämoglobins von demselben irgend eine stickstoffhaltige Substanz abspaltet. Es ist ganz möglich, dass die abgespaltene Substanz ein dritter stickstoffreicher albumosenartiger (nach F. Schulz) Bestandtheil des Oxyhämoglobins ist. Leider sind die Filtrate vom Jodhämoglobin verloren gegangen, und ich untersuchte nicht näher jenen scheinbar albumosenartigen Niederschlag, den ich immer, wenn auch in sehr kleiner Menge, beim Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung zu den Filtraten bekam. Ob beim Jodiren des Oxyhämoglobins etwa theilweise Eisenabspaltung stattfindet, wie dies nach F. Hopkins und S. Pinkus (l. c.) beim Bromiren des Hundeoxyhämoglobins der Fall ist, kann ich nicht mit Sicherheit behaupten. Die von mir erhaltenen Eisenwerthe für Jodhämoglobin lassen darauf keine bestimmte Antwort geben, weil der Eisengehalt im Pferdeoxyhämoglobin bis jetzt noch nicht festgestellt ist (von 0,33 bis 0,47%). Im Hinblick aber auf mögliche Verluste bei der von mir angewandten Methode für Eisenbestimmung

1) F. Schulz, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIV, S. 449, 1898.

hämoglobins im Jodhämoglobin vorhanden sei. Es wäre vielleicht zu frühzeitig, die von mir erhaltenen Analysenwerthe für das Jodhämoglobin in einer Formel auszudrücken, während dieselbe sogar für das krystallisirende Oxyhämoglobin selbst noch nicht aufgestellt ist. Die Jodaufnahmefähigkeit des Oxyhämoglobins (ca. 11% Jod) steht sehr nahe zu der des krystallisirten Serumalbumins (ca. 12% Jod), mit welchem das Oxyhämoglobin manche molekularphysikalischen Eigenschaften, so die Löslichkeit in Wasser und die Fähigkeit, aus halbgesättigter Ammonsulfatlösung auszukrystallisiren, gemein hat. Obwohl auch die Hämatin-Gruppe des Jodhämoglobins, wie dies unter Anderem auch aus den Pepsinverdauungsversuchen hervorgeht, das Jod enthält, so muss man doch annehmen, dass die Jodaufnahmefähigkeit des Globins selbst eigentlich derjenigen des krystallisirten Serumalbumins noch näher steht, wenn auch nicht die gleiche sein wird.

Was das Verhalten des Jodhämoglobins zur Pepsinverdauung anbelangt, so sprechen die von mir kürzlich angeführten Versuche, wie es scheint, dafür, dass die Abspaltung der jodhaltigen Hämatin-Gruppe vom Jodhämoglobin schon im Stadium der Albumosenbildung geschieht. Bei der Trypsinverdauung des Jodhämoglobins konnte ich eine Abspaltung der Hämatin-Gruppe mit ihren charakteristischen Eigenschaften nicht constatiren: der bei Neutralisation der Verdauungsflüssigkeit erhaltene Niederschlag löste sich immer vollständig beim Ansäuern mit 0,5%iger  $\text{ClH}$ , während das freie Hämatin oder das Jodprodukt des Hämatins bei solchen Bedingungen unlöslich ist. Jedenfalls bedarf das Verhalten des Jodhämoglobins, auch des Oxyhämoglobins selbst und des Hämatins zur Pepsin- und Trypsinverdauung eingehenderen Studiums.

Der Versuch, das Jodprodukt des Hämatins darzustellen, ist, wie man aus Analysenzahlen sieht, nicht gelungen: das von mir erhaltene Produkt scheint nicht völlig jodirt und dabei im Vergleich mit dem Hämatin selbst sehr verändert zu sein. Ich beabsichtige, das Verhalten des Jodhämoglobins im Thierkörper noch weiter zu untersuchen.

---

## **Zur Chemie der Paranucleinsäure**

Von

**P. A. Levene und C. Alsberg.**

---

(Aus der physiologisch-chemischen Abtheilung des Pathologischen Instituts der  
New-Yorker Staatskrankenhäuser.)

(Der Redaction zugegangen am 10. Dezember 1900.)

---

Durch die Untersuchungen von A. Kossel wurde festgestellt, dass die Nucleine von Eidotter und Kuhmilch sich von anderen Nucleinen dadurch unterscheiden, dass sie keine Xanthinbasen in ihrem Moleküle enthalten. Doch hat Altman die sauerreagirende Substanz, die er aus dem Eidotternucleine gewann, als eine echte, nur von Eiweiss verunreinigte Nucleinsäure beschrieben.

Später widmete Milroy derselben Substanz eine gründlichere Untersuchung und kam zu dem Schlusse, sie unterscheide sich von der wahren Nucleinsäure durch folgende Merkmale:

1. Sie ergibt bei der Zersetzung mit Säuren keine Xanthinbasen.
2. Sie gibt keine Millonreaction, wohl aber die Biuretprobe.
3. Das Verhältniss des P zu dem N ist ein anderes als bei den wahren Nucleinsäuren.

Ferner muss erwähnt werden, dass es bisher Niemandem gelungen ist, in dem Paranuclein des Eidotters eine Kohlehydratgruppe nachzuweisen.

Während die Nucleinsäuren nach den Untersuchungen von A. Kossel und A. Neumann Lävulinsäure liefern, waren

Lavulinsäure zu gewinnen, vergeblich.

Eine neue gründliche Untersuchung der sogenannten Paranucleinsäure schien uns sehr wünschenswerth und von dieser Absicht aus ist diese Arbeit unternommen worden.

Das Material zur Gewinnung der Säure war Avivetellin. Mit dem Namen « Vitellin » bezeichnen wir die Paranucleo-verbinding des Eidotters. Es wurde auf folgende Weise gewonnen:

Der Eidotter wurde mechanisch von dem Eiweiss getrennt, dann mit einem gleichen Volumen 10%iger NaCl-Lösung tüchtig gemischt, mit Aether geschüttelt und 24 Stunden stehen gelassen. Hierauf wurde der Aether abgegossen, die NaCl-Lösung des Dotters wieder mit Aether geschüttelt und über Nacht stehen gelassen. Nachdem der Aether ungefähr dreimal erneuert worden war, wurde die NaCl-Lösung vollständig durchsichtig und liess sich sehr leicht filtriren. Die Behandlung mit Aether wurde fortgesetzt, bis durch denselben nur wenig Farbstoff mehr entzogen wurde. Die NaCl-Lösung wurde dann in mindestens das 20fache Volumen Wasser gegossen und das Vitellin dadurch niedergeschlagen.

Das oben schwimmende Wasser wurde sodann abgegossen und durch frisches ersetzt. Dieses Verfahren wurde mehrmals wiederholt, dann wurde das Vitellin abfiltrirt, wieder in 10%iger NaCl-Lösung aufgelöst und nochmals mit Aether in einem Scheidetrichter wie vorher geschüttelt.

Die NaCl-Lösung wurde dann filtrirt und das Vitellin durch einen grossen Ueberschuss von Wasser niedergeschlagen. Das Wasser wurde alsdann ein paar Mal erneuert, der Niederschlag abfiltrirt. Einige Präparate wurden dann nur mit kaltem Alkohol und Aether extrahirt, andere auch mit heissem Alkohol und Aether, und diese Extraction wurde so lange fortgesetzt, bis beinahe nichts mehr entzogen wurde. Dies wurde unternommen, um zu prüfen, welches das Verhältniss des Lecithins gegenüber dem Vitellin ist.

Wie bekannt, wird seit Hoppe-Seyler von den meisten Forschern angenommen, dass in dem Dotter das Vitellin mit

Lecithin in einer chemischen Verbindung ist. Andere dagegen wie Salkowski haben die Ansicht geäußert, dass das Lecithin nur eine Verunreinigung sei. Kürzlich hat sich auch T. Osborne zu Gunsten der Hoppe-Seyler'schen Anschauung ausgesprochen.

Die Analyse unserer Präparate zeigte, dass manche Präparate, die längere Zeit mit heissem Alkohol und Aether extrahiert waren, mehr Phosphor enthielten wie diejenigen, die nur mit kalten Extraktionsmitteln behandelt waren. So zum Beispiel enthielten die nur mit kaltem Alkohol behandelten zwei Präparate 0,84% und 1,22% P, und zwei von denen, die mit Alkohol und Aether gekocht waren, 0,88% und 1,21% P.

Wir haben vorläufig aus äusseren Gründen auf eine gründlichere Untersuchung der Frage verzichten müssen; doch ist uns die Ansicht von Salkowski wahrscheinlicher wie die andere. Wir hoffen auf diese Frage zurückzukommen.

Zur Herstellung der «Avivitellinsäure», wie wir die Paranucleinsäure des Vitellins zu nennen vorschlagen, wurde gewöhnlich die ungereinigte Substanz benutzt, d. h. letztere wurde nicht ein zweites Mal in NaCl-Lösung aufgelöst.

Die Säure wurde gewonnen nach der Methode, welche schon einer von uns veröffentlicht hat. Das Vitellin wurde in Wasser aufgenommen (400 ccm. wurden gewöhnlich für das Vitellin aus 100 Eiern verwendet), hierauf ein halbes Volumen starkes Ammoniumwasser (25%) hinzugefügt. Das Gemisch wurde ungefähr 2 Stunden lang stehen gelassen, dann allmählich und langsam durch Essigsäure neutralisirt; es wurde Eis hinzugefügt, um das Gemisch während der Neutralisation kalt zu erhalten. Wenn die Reaction neutral oder beinahe neutral war, so wurde ein beträchtlicher Ueberschuss von Pikrinsäure zugegeben (ca. 100 ccm. einer gesättigten Lösung) und dann noch mehr Essigsäure, bis die Reaction stark sauer war. Die Flüssigkeit wurde abfiltrirt, das Filtrat mit einigen Volumen Alkohol behandelt und dadurch ein Niederschlag gebildet. Dieser in Wasser lösliche Niederschlag konnte durch Essigsäure nicht wieder gefällt werden. Die essigsäure Lösung dieser Substanz, in eine essigsäure

verhielt sich also ebenso wie die wahre Nucleinsäure.

Der erste Niederschlag durch Alkohol wurde in  $H_2O$  wieder gelöst und mit Essigsäure angesäuert. Alsdann wurde einem abgemessenen kleinen Theil der Lösung Alkohol hinzugefügt, der 0,5% HCl enthielt, bis das Gemisch auf Congo sauer reagierte. Hierauf wurde der Rest der Lösung der Substanz in eine danach berechnete Quantität desselben Alkohols gegossen.

Der dadurch gebildete Niederschlag wurde zuerst mit 50%, dann mit 80% und 95% Alkohol gewaschen, bis er chlorfrei wurde, hierauf mit kochendem Alkohol und Aether extrahirt. 0,2603 des Präparates wurden mit Natriumcarbonat + Kaliumnitrat geschmolzen.  $Mg_2P_2O_7 = 0,0903$ .  $P = 9,69\%$ .

Eine ähnliche von Altmann gewonnene Substanz enthielt ca. 7,0%, die von Milroy gewonnene dagegen 7,51 bis 7,94% P.

Um festzustellen, ob es möglich sei, eine Substanz mit noch höherem P-Gehalt zu gewinnen, wurde der ursprüngliche Niederschlag nochmals gelöst und niedergeschlagen und erst dann analysirt.

### Präparat IIIa.

Der erste Niederschlag, in Wasser aufgenommen, ging beinahe ganz in Lösung über und hinterliess nur eine geringe Trübung, die nach Hinzufügung von einigen Tropfen starken Ammoniaks verschwand. Dann wurde essigsaures Ammonium hinzugefügt, die Lösung durch Essigsäure sauer gemacht und die Substanz mittelst Alkohol ausgeschieden. Dieses Verfahren wurde zweimal wiederholt. Der auf diese Weise gewonnene Niederschlag war vollkommen in Wasser löslich. Die so entstandene Lösung wurde durch Ammoniakwasser alkalisch gemacht, ungefähr zwei Stunden stehen gelassen und dann in eine vorher abgemessene Menge Alkohol gegossen, der 0,5% HCl enthielt (nach der oben beschriebenen Methode). Die Substanz wurde hierauf gewaschen und extrahirt, wie oben angegeben.

0,1775 g der Substanz bei 100° C. getrocknet und wie oben geschmolzen ergaben  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0632$  g,  $\text{P} = 9,95\%$ .

0,3968 g der Substanz wurden durch 20 ccm. Schwefelsäure und 10 g  $\text{K}_2\text{SO}_4$  zersetzt und der Stickstoff nach Kjeldahl's Methode bestimmt. 50 ccm.  $\frac{\text{N}}{10}\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 12,1 ccm.  $\frac{\text{N}}{10}\text{NaOH}$ .  $\text{N} = 13,39\%$ .

0,123 g derselben Substanz wurden auf dieselbe Weise behandelt. 40 ccm.  $\frac{\text{N}}{10}\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 27,9 ccm.  $\frac{\text{N}}{10}\text{NaOH}$ .  $\text{N} = 13,77\%$ .

### Präparat V.

Der erste Niederschlag wurde wieder in Wasser und genügend Ammonium, um die Lösung zu vervollständigen, aufgelöst. Letztere wurde dann mit Alkohol behandelt und dadurch ein Niederschlag gebildet. Dieser letzte Niederschlag wurde wieder in Wasser gelöst und die Lösung in ein abgemessenes Volumen durch 0,5%  $\text{HCl}$  angesäuerten Alkohols gegossen. Endlich wurde der Niederschlag, wie oben angegeben, gewaschen und extrahirt.

0,2199 g dieser Substanz wie oben geschmolzen ergaben  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,078$  g.  $\text{P} = 10,02\%$ .

0,2466 g wurden zur Stickstoffbestimmung wie oben benutzt. 50 ccm.  $\frac{\text{n}}{10}\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 25,2 ccm.  $\frac{\text{n}}{10}\text{NaOH}$ .  $\text{N} = 14,07\%$ .

0,1258 g wurden ebenso zur Stickstoffbestimmung behandelt. 40,1 ccm.  $\frac{\text{n}}{10}\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 27,5 ccm.  $\frac{\text{n}}{10}\text{NaOH}$ .  $\text{N} = 13,94\%$ .

Präparat VIII wurde wie Präparat III behandelt, mit dem einzigen Unterschiede, dass das Verfahren nicht zweimal, wie bei letzterem, sondern dreimal wiederholt wurde.

0,2322 g des Präparates wurden wie oben geschmolzen.  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0811$  g.  $\text{P} = 9,79\%$ .

0,2644 g wurde zur Stickstoffbestimmung benutzt, wie oben. 50 ccm.  $\frac{\text{n}}{10}\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 22 ccm.  $\frac{\text{n}}{10}\text{NaOH}$ .  $\text{N} = 14,07\%$ .

	P	N
I.	9,69	—
III.	9,95	13,58
V.	10,02	14,00
VIII.	9,79	14,07



des verschiedenen Grades der Reinigung die Substanz in Bezug auf ihren Gehalt an P und sogar an N wenig variirt. Nun haben aber alle, welche mit Nucleinsäure gearbeitet haben, die Thatsache beobachtet, dass es sehr schwierig ist, die Basen aus den Salzen wegzuschaffen.

Aus diesem Grunde wurde es für rathsam gehalten, irgend ein Salz, das in Wasser unlöslich ist, zu analysiren. Das Kupfersalz erwies sich für diesen Zweck als das passendste.

Das Salz wurde auf folgende Weise hergestellt: Ungereinigte Paranucleinsäure wurde so oft gelöst und niedergeschlagen, bis sie vollständig in Wasser löslich wurde. (Dies wurde durch das anhaftende Ammoniumacetat verursacht.) Diese Lösung wurde dann filtrirt und dem Filtrate so viel Kupferchlorid hinzugefügt, bis es anfang, auf Congopapier zu reagiren. Der Niederschlag des Kupfersalzes der Nucleinsäure wurde abfiltrirt, mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser kupferfrei war, sodann mit Alkohol, bis es chlorfrei war, endlich mit heissem Alkohol und Aether. (Dieses Verfahren nahm gewöhnlich ungefähr 3 Tage in Anspruch; während der Nacht wurde der Niederschlag gewöhnlich von dem Filtrirpapier abgenommen und in Wasser gut verrieben.)

#### Präparat V.

Das Cu-Salz war aus dem oben analysirten Präparat V dargestellt.

0,1564 g wurde mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat zur Kupfer- und Phosphorbestimmung geschmolzen.

$\text{CuO} = 0,023$ ,  $\text{Cu} = 12,36\%$ .

$\text{Mg P}_2\text{O}_7 = 0,0480$  g,  $\text{P} = 8,57$ ; für die freie Säure = **9,78%**.  
0,1177 g wurden nach Kjeldahl zersetzt.

40,0 ccm.  $\text{n}/_{10}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 30,3 ccm.  $\text{n}/_{10}$   $\text{NaOH}$ ;  $\text{N} = 11,55$ ; für die freie Säure = **18,05**.

#### Präparat XV.

C- und H-Bestimmung.

I. 0,2152 g von der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,2282 g  $\text{CO}_2$ ;  $\text{C} = 28,90\%$ ;  $\text{H}_2\text{O} = 0,0995$ ;  $\text{H} = 5,13\%$ .

II. 0,1950 g ergaben bei der Verbrennung 0,2038 g  $\text{CO}_2$ , C = 28,46%, und 0,088 g  $\text{H}_2\text{O}$  — H = 5,01%.

0,4030 g wurden zur P- und Cu-Bestimmung geschmolzen.

$\text{CuO} = 0,0617$  g — Cu = 12,20%;  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,1280$ , P = 8,87%, für die freie Säure 10,11%.

0,2250 g wurden nach Kjeldahl behandelt. 41,0 ccm.  $n/10$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 22,1 ccm.  $n/10$  NaOH. N = 11,76% oder 13,38% für die freie Säure.

0,5490 g wurden mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat zur Schwefelbestimmung geschmolzen.

$\text{BaSO}_4 = 0,0102$ , S = 0,2557.

### Präparat XVI.

#### C- und H-Bestimmung.

0,1853 g der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,1780 g  $\text{CO}_2$ ; C = 26,20 und 0,0747 g  $\text{H}_2\text{O}$  — H = 4,53%.

0,1938 g der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,1859 g  $\text{CO}_2$ ; = 26,26 und 0,0795  $\text{H}_2\text{O}$ ; H = 4,33%.

0,1405 g wurden zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl behandelt, 40,0 ccm  $n/10$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  erforderten zur Neutralisirung 29,4 ccm.  $n/10$  NaOH. N = 10,56%; für die freie Säure übergerechnet N = 12,97%.

0,2860 g wurden mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat zur P- und Cu-Bestimmung zusammengeschmolzen.

$\text{CuO} = 0,062$ ; Cu = 17,95%,  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 = 0,0818$ , P = 7,99; für die freie Säure übergerechnet = 9,74%.

0,6722 g der Substanz wurden mit Natriumcarbonat und Kaliumnitrat zur Schwefelbestimmung zusammengeschmolzen.

$\text{BaSO}_4 = 0,0138$  g. — S = 2979.

Folgende Tabelle gibt die Resultate für die kupferfreie Substanz übergerechnet:

		C	H	N	P	S
Präparat	V.	—	—	13,05	9,78	—
	XV.	32,66	5,77	13,38	10,11	0,2912
	XVI.	31,96	5,39	12,97	9,74	0,3620
	Mittel:	32,31	5,58	13,13	9,88	0,3266.

Zur Eisenbestimmung wurden 2 g von dem Präparat XVII gründlich mit Natriumcarbonat gemischt und dann mit verdünnter Salzsäure behandelt. Der Rest wurde gegläht, bis aller Kohlenstoff weggebrannt war, und das Eisen durch Titrieren mit  $\text{KMnO}_4$  bestimmt. Es enthielt 0,57% Fe.

Die freie «Paranucleinsäure» ist unlöslich in Wasser, in schwacher Säure, sowie in Alkohol und Aether; sie ist aber

Ammoniak. Die Ammonium-, Natrium- und Kaliumsalze sind in Wasser löslich, die Baryum-, Kupfer- und Eisensalze dagegen unlöslich. Im Zusammenhang mit der verschiedenen Löslichkeit der Salze muss eine Eigenthümlichkeit hervorgehoben werden, nämlich der Einfluss des Alkohols auf die Löslichkeit. Wenn man die freie Säure in Wasser aufnimmt, Ammoniakwasser zugibt, um die Lösung zu vervollständigen, dann Alkohol hinzugiesst, bis das Salz der Paranucleinsäure vollständig niedergeschlagen ist, und einige Zeit stehen lässt, so bleibt der Niederschlag in Wasser löslich, und dasselbe Verfahren kann beliebig oft wiederholt werden, ohne dass die Löslichkeit der Substanz beeinflusst wird.

Wenn man aber Natron- oder Kalihydrat statt Ammoniak verwendet, um die Lösung der Paranucleinsäure zu vervollständigen, und das Experiment wie zuvor wiederholt, dann verliert das Natron oder Kalisalz, welches man unter Alkohol stehen lässt, allmählich die Löslichkeit. In Wasser aufgenommen, schwillt ein solches Natron- oder Kalisalz zu einer gelatinösen Masse an, die sich nicht filtriren lässt. In Gegenwart von Acetaten verbessert sich die Löslichkeit nicht. Wir versuchten auch, die Acetate hinzuzufügen, ehe der Alkohol zugegossen wurde, um dem coagulirenden Einfluss der letzteren vorzubeugen, jedoch ohne Erfolg. Ein solches unlösliches Natronsalz war auf seinen Phosphorgehalt untersucht und erwies 8,92% P. (Diese Eigenschaft der Paranucleinsäuren kann vielleicht als Anhaltspunkt dazu dienen, sie von der wahren Nucleinsäure zu trennen; dieses Problem wollen wir uns vorbehalten.)

#### Ueber das Proteid der Vitellinsäure.

Die Säure gibt eine sehr charakteristische Reaction mit der Biuretprobe. Dadurch bewies Milroy, dass die Substanz nicht proteinfrei war. Viele Versuche wurden von uns gemacht, um dieses Eiweiss wegzuschaffen; sie waren alle vergeblich. Eines von den Experimenten verdient jedoch erwähnt zu werden.

Schmiedeberg hat seine Chondroitinschwefelsäure und später verschiedene Nucleinsäuren dadurch gereinigt, dass er das ungereinigte Material in Alkalien auflöste, denen er essigsaure Kupferlösung und dann Alkohol hinzufügte. Dadurch bildet sich ein Niederschlag, welcher das Kupfersalz der Säure enthält; das Eiweiss bleibt in der Lösung, welche die violette Biuretfarbe zeigt.

Wird Vitellin auf dieselbe Weise behandelt, so reagirt es, wie Schmiedeberg es beschreibt. Wenn man aber das Experiment mit der Vitellinsäure wiederholt, so ist das Resultat ein anderes.

So wurden z. B. ca. 10 g der Säure in 150 ccm. einer 10%igen Lösung von Natronhydrat gelöst, sodann eine Lösung von Kupferacetat hinzugefügt, die einen Niederschlag von Kupferhydroxyd verursachte. Hierauf wurde noch mehr von der Natronhydratlösung hinzugefügt und zuletzt das Ganze mit 2 Volumen Alkohol behandelt. Es wurde über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag nahm die violette Färbung an, welche für die Biuretprobe charakteristisch ist; das Filtrat war gelblich und enthielt keine Spur von Biuret.

Der Niederschlag war in Wasser löslich. Eine solche Lösung wurde dann mit Lösungen von Natriumhydroxyd und Kupferacetat wie vorher behandelt. Diese letztere Lösung zeigte dann die für Biuret charakteristische Färbung. Dann wurde das gleiche Volumen Alkohol hinzugegossen und das Ganze über Nacht stehen gelassen. Der Niederschlag hatte dieselbe violette Färbung, das Filtrat war gelblich und absolut biuretfrei.

Dies schien anzuzeigen, dass nicht alles Proteid im Vitellin auf dieselbe Weise an die Phosphorsäure gebunden ist, dass vielmehr ein Theil möglicher Weise eine engere Verbindung eingegangen ist, wahrscheinlich unter der Form eines Esters und dadurch die Paranuclein- oder Vitellinsäure bildet, welche letztere den Rest des Proteids in Form eines Salzes bindet.

Das ist natürlich eine blosse Hypothese.

seine Substanz, die ca. 7,5% P enthält, die Reaction nicht gab. Dieser Umstand ist von grosser Bedeutung im Hinblick auf die neuesten Untersuchungen über die chemische Zusammensetzung der verschiedenen Spermen; in letzteren ist die Nucleinsäure verbunden mit Protamin, welches nur die Biuretfarbenprobe und nicht die Millonprobe zeigt.

Mit Bezug darauf haben wir 13 Präparate untersucht, welche alle die Millonprobe zeigten, vorausgesetzt, dass sie gründlich von Acetaten und Chloriden frei gewaschen wurden. Wenn diese Vorsichtsmassregel unterlassen wurde, so ergaben sie letztere Reaction nicht.

Es war jedoch nicht unwahrscheinlich, dass die Millonprobe zeigende Substanz nur eine Verunreinigung der reinen «Paranucleinsäure» war und letztere Säure eine Verbindung eines Protamins mit irgend einer Phosphorsäure ist. In diesem Falle sollte das stickstoffenthaltende Radical meistens aus «Hexon»-Basen bestehen.

Um diese Vermuthung zu bestätigen, wurden ungefähr 75 g der Paranucleinsäure mit einer 20%igen Lösung von Salzsäure 72 Stunden lang zersetzt. Die dabei gebildete Quantität Melanin war sehr bedeutend; die Beschaffenheit desselben wurde jedoch nicht untersucht.

Die von Melanin befreite Flüssigkeit enthielt 3,45 g Stickstoff in Gestalt organischer Verbindungen.

Der Arginin enthaltende Bruchtheil enthielt 0,616 g N oder 17,82% des organischen Stickstoffs.

Das Arginin wurde durch das Silbersalz erkannt. 0,200 g des Salzes gaben 0,0704 AgCl;  $\text{Ag} = 26,47\%$ ; für  $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{HNO}_3 + \text{AgNO}_3$  berechnet  $\text{Ag} = 26,54\%$ .

Das Histidin wurde als salzsaures Salz erhalten. Ein wenig über 0,5 g oder 0,1 g Stickstoff wurde gewonnen = etwa 3% des organischen Stickstoffs.

0,4502 g des letzteren gaben 0,3180 g AgCl.  $\text{Cl} = 17,47\%$ . Für  $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$  berechnet = 16,90%.

Der das Lysin und andere stickstoffhaltige Substanzen enthaltende Bruchtheil ging durch Unfall verloren.

Die zur Gewinnung der «Hexon»-Basen benutzten Methoden waren diejenigen, welche in verschiedenen Arbeiten beschrieben wurden, die im Laufe der letzten Jahre aus Professor Kossel's Laboratorium hervorgegangen sind.

Das Ergebniss des Zersetzungsversuches mit der Vitellinsäure rechtfertigt die Annahme nicht, dass das Proteid des Säuremoleküls von der Beschaffenheit eines Protamins sei. Die Eigenschaft, eine positive Millonprobe zu ergeben, deutet auf dieselbe Schlussfolgerung hin.

Mit anderen Worten: Die verhältnissmässig constante Zusammensetzung der verschiedenen untersuchten Präparate, ihr Verhalten gegen Millon- und Biuretprobe, und zur Probe Schmiedeberg's, endlich der Zersetzungsversuch weisen alle auf dieselbe Schlussfolgerung hin, dass die Vitellinsäure eine Verbindung von Eiweiss mit Phosphorsäure sei, möglicher Weise in der Form eines Esters. Die Thatsache, dass es einem von uns geglückt ist, nach derselben Methode, vermittelt welcher die Vitellinsäure erhalten wurde, ohne Mühe verschiedene Nucleinsäuren vollständig biuretfrei zu gewinnen, scheint diese Schlussfolgerung zu bestätigen.

Es muss aber hinzugefügt werden, dass die Verbindung nicht sehr beständig ist. Stellt man eine Lösung von Vitellinsäure in 2%iger Lösung von kohlensaurem Natrium nur 5—10 Minuten auf ein Wasserbad, so zersetzt sie sich. Eine solche Lösung enthält freie Phosphorsäure; säuert man mit Salzsäure an und gibt Alkohol hinzu, so entsteht ein Niederschlag, der ärmer an Phosphor ist, als die ursprüngliche Säure.

Dasselbe geschieht, wenn man die Vitellinsäure durch einen Ueberschuss von Salzsäure niederschlägt.

#### Ueber das Eisen in der Vitellinsäure.

Bunge war der erste, der auf das Eisen in dem Nuclein des Eidotters aufmerksam machte. Nach seiner Ansicht ist das darin enthaltene Eisen nicht direkt an den Kohlenstoff gebunden, indem es mit demselben eine organische Verbindung bildet. Auch existirt es nicht in der Form eines gewöhnlichen

Alkohol, der mit Salzsäure angesäuert war, extrahirt werden, durch Ammonsulfid wurde das Eisen erst nach langem Stehen aus der Nucleinlösung niedergeschlagen.

Ascoli untersuchte die Angelegenheit von Neuem in Professor Kossel's Laboratorium. Er fand, dass metaphosphorsaures Eisen auf eine ähnliche Weise wie Bunge's Hämatogetri reagirt, und er schliesst daraus, das Eisen sei in letzterem in der Form eines Metaphosphats enthalten.

Es schien uns, dass diese Schlussfolgerungen des Herrn Ascoli auf die Paranucleinsäure nicht ohne Weiteres zu übertragen sind, und zwar aus dem folgenden Grunde: In den metaphosphorsauren Salzen kann das Eisen auch mit allen gewöhnlichen Proben entdeckt werden, wenn zu einer Lösung von Eisenmetaphosphat so viel Salzsäure zugegeben wird, dass die Lösung auf Congo sauer reagirt.

Mit der Vitellinsäure ist das aber nicht immer der Fall, wie aus dem folgenden Experimente zu sehen ist.

Etwas Vitellinsäure wurde mit Hülfe von Ammoniakwasser gelöst und dann mit soviel Salzsäure niedergeschlagen, bis die Lösung auf Congo sauer reagirte. Der Niederschlag wurde dann mit destillirtem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser eisenfrei war. Es wurde wieder aufgelöst, wieder auf dieselbe Weise niedergeschlagen, nochmals filtrirt und gewaschen. Dieses wiederholte Niederschlagen wurde solange fortgesetzt, bis die Salzsäure aufhörte, Eisen zu entziehen. Die Probe auf Eisen wurde mit Ammoniumsulfocyanid und Aether vorgenommen. Erst wenn der Aether vollständig farblos blieb, wurde die Reinigung als beendet angesehen.

Wurde eine Vitellinsäure nach so oft wiederholtem Niederschlagen nochmals aufgelöst, mit Salzsäure angesäuert, bis sie auf Congo sauer reagirte, und so über Nacht stehen gelassen, dann zeigte das Salzsäurefiltrat wieder das Vorhandensein von Eisen.

### **Litteratur.**

- Altmann, Arch. f. Anat. u. Physiol. 1889.  
Ascoli, Zeitschr. f. physiol. Chem. XXVIII.  
Bunge, Zeitschr. f. physiol. Chem. IX, 49.  
Kossel, Untersuchungen über die Nucleine, Strassburg 1881.  
— Zeitschr. f. physiol. Chem. X, 248.  
— Verhandlungen d. Congresses f. innere Medicin, 14, 188—189;  
    (ibid. Ruppel).  
Levene, Journal of the American Chemical Society, vol. XXII, p. 6.  
Milroy, Zeitschr. f. physiol. Chem. XXII, 307.  
Osborne & Campbell, Reprint from the twenty-third Report of the  
    Connecticut Agricultural Experiment Station. — New Haven,  
    Conn. —.  
Salkowski, Practicum d. physiol. Chem.  
Schmiedeberg, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. 43, 57.
-



# **Die Bestimmung des Amidosäurenstickstoffes im Harn.**

Von

**Martin Krüger und Julius Schmid.**

---

(Aus der medicinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 18. December 1900.)

---

Im Band XXX, Seite 75, der Zeitschrift für physiologische Chemie hat M. Pfaundler über ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffes im Harn berichtet. Wir haben im Laufe des letzten Sommersemesters zu demselben Zwecke eine Methode ermittelt, welche im Principe dieselbe sein musste, wie die von Pfaundler, da ja die auszuführenden Operationen durch die bekannten, von anderer Seite festgestellten Eigenschaften der Amidosäuren, das sind die Nichtfällbarkeit durch Phosphorwolframsäure und ihre Beständigkeit gegen Säuren und Alkalien, gegeben waren.

Was die Fällung durch Phosphorwolframsäure betrifft, so haben wir nicht, wie Pfaundler vorschreibt, auf ein bestimmtes Volumen Harn stets die gleiche Menge an Phosphorwolframsäure angewendet. Denn nach den Beobachtungen von Gumlich<sup>1)</sup> und Schmied<sup>2)</sup> löst ein Ueberschuss der Säure einen Theil der zuerst gefällten, stickstoffhaltigen Körper wieder auf. Dieses Lösungsvermögen ist jedoch nur gering, wie folgende Versuche zeigen.

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVII, S. 15.

2) Dubois' Archiv, 1894, S. 552.

Je 10 ccm. Harn wurden nach Zusatz eines Cubikcentimeters 1%iger Salzsäure mit 14, resp. 15, 16 und 20 ccm. Phosphorwolframsäurelösung versetzt. Bei 16 ccm. war nach Gumlich die vollständige Fällung eingetreten. In je 10 ccm. der 4 Filtrate wurde dann der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Für die Gesamtfiltrate berechnet wurden an  $\frac{1}{10}$  N.-Säure verbraucht: 45,53, 45,11, 44,44 und 44,73 ccm. Ein Ueberschuss von 4 ccm. der Säure hat demnach eine Menge an stickstoffhaltigen Körpern gelöst, welche 0,29 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Säure entspricht.

Bei einem zweiten, in gleicher Weise ausgeführten Versuche wurden je 10 ccm. Harn + 1 ccm. Salzsäure mit 4, 5, 6, 7 und 10 ccm. Phosphorwolframsäure versetzt. Bei 6 ccm. war die Fällung vollständig. Verbraucht wurden für die Gesamtfiltrate 11,01, 11,07, 10,76, 10,98 und 11,03 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Säure. Gelöst ist von 4 ccm. überschüssiger Phosphorwolframsäure an stickstoffhaltigen Substanzen soviel, als 0,27 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Säure entspricht.

Wenn demnach der durch einen Ueberschuss von Phosphorwolframsäure bedingte Fehler nur klein ist, kann man denselben doch nicht vernachlässigen und die Forderung, für jeden Harn die Menge der Säure festzustellen, nicht umgehen. Allerdings genügt die Austitrirung bis auf 1 ccm.

Die Trennung der Amidosäuren von Harnstoff haben wir ebenfalls durch hydrolytische Spaltung des letzteren in Ammoniak und Kohlensäure bewirkt. Dieselbe erfolgt durch Erhitzen von Harnstofflösungen für sich auf hohe Temperaturen oder bei Gegenwart von Säuren und Alkalien.

Nach den Untersuchungen von M. Krüger<sup>1)</sup> und später von C. Wulff<sup>2)</sup> werden die Purinkörper durch 12—14stündiges Erhitzen auf 180—200° mit concentrirter Salzsäure oder verdünnter Schwefelsäure (2 Volumen Wasser + 1 Volumen concentrirter Schwefelsäure) glatt in Ammoniak resp. in alkylirtes Ammoniak und in 1 Molekül Glycocoll resp. alkylirtes

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVI, S. 167 u. Bd. XVIII, S. 453.

2) Ibidem.

selbst in solchen Fällen, wo sie sich gleichsam in statu nascendi befinden, beim Erhitzen mit Säuren der genannten Concentration während 14 Stunden und bis zu Temperaturen von 200° völlig beständig sind.

Wir haben daher das Filtrat vom Phosphorwolframsäure-niederschlag mit dem halben Volumen concentrirter Schwefelsäure versetzt und uns durch Versuchsreihen überzeugt, dass ein 3—4stündiges Erhitzen auf 160—180° im geschlossenen Rohr allen Harnstoffstickstoff in Ammoniak überführt.

M. Pfaundler hat von einer Säurebehandlung im geschlossenen Rohr mit Rücksicht auf die angestrebte klinische Verwendbarkeit der Methode abgesehen. Weshalb ein solches Verfahren nicht klinisch anwendbar sein soll, ist nicht recht verständlich; etwa wegen der nothwendigen Beschaffung eines Schiessofens oder der erforderlichen Fähigkeit des Analytikers, Glasröhren zuzuschmelzen?

Bei der Destillation des Ammoniaks haben wir ebenfalls zunächst versucht, die Hauptmenge der Säure durch fixe Alkalien abzustumpfen und das Ammoniak durch Magnesia usta in Freiheit zu setzen. Wir konnten uns jedoch sofort davon überzeugen, dass nach dem Ueberdestilliren des freien Ammoniaks nachheriger Zusatz von Natronlauge kein weiteres Ammoniak mehr abspaltete, ein Resultat, welches auf Grund der erwähnten Versuche über Spaltung der Purinkörper zu erwarten war, da hier gleichfalls bei Anwendung von Natronlauge die theoretischen Werthe gefunden werden.

### Ausführung der Methode.

Man ermittelt zunächst nach Pflüger und Gumlich die zur vollständigen Fällung des Harnes<sup>1)</sup> nothwendige Menge an Phosphorwolframsäure, indem man zu je 10 ccm. Harn 1 ccm. 10%ige Salzsäure und dann wechselnde Mengen 10%iger

---

1) Concentrirte Harne, wie Hundeharn, müssen bekanntlich vorher verdünnt werden.

Phosphorwolframsäure gibt. Der Niederschlag setzt sich in allen Fällen leicht ab. Man filtriert noch 2 Minuten. Das erste Filtrat läuft in der Regel trübe ab, nach mehrmaligem Aufgiessen erhält man jedoch eine klare Flüssigkeit. Zu etwa 1 ccm. derselben gibt man 1 ccm. Phosphorwolframsäurelösung. Tritt nach 2 Minuten keine Trübung mehr ein, so ist die Fällung vollständig. Bestimmt man die Mengen der Phosphorwolframsäure erst bis auf 10 ccm., dann bis auf 5, und schliesslich bis auf 1 ccm. genau, so nimmt die Operation nur kurze Zeit in Anspruch. Bei längere Zeit an einem Individuum fortgesetzten Versuchen hat man ausserdem, wenn der Harn stets auf dasselbe Volumen gebracht wird, an den Säurezahlen der vorhergehenden Tage einen guten Anhaltspunkt.

Ist die Säurezahl gefunden, so gibt man zu einer grösseren Menge, etwa 30 ccm., Harn 3 ccm. 10%ige Salzsäure und die berechnete Menge an Phosphorwolframsäurelösung hinzu und filtriert nach 2 Minuten durch ein trockenes Filter in ein trockenes Gefäss. Gumlich und Andere lassen die Fällung 24 Stunden in einer ammoniakfreien Atmosphäre stehen. Da wir jedoch bei der Filtration niemals Schwierigkeit gehabt haben, und das Ausfallen eines nochmaligen Niederschlages im Filtrate nicht eintrat, so haben wir von dieser Vorschrift abgesehen.

Nach Herstellung des Filtrates werden folgende Bestimmungen ausgeführt:

1. Es wird in 5 ccm. des ursprünglichen Harnes der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

2. In je 10 ccm. des Filtrates resp. einer solchen Menge, welche 5 ccm. Harn annähernd entspricht, wird:

a) der Gesamtstickstoff, welchen wir Harnstoffstickstoff + Amidosäurenstickstoff nennen wollen, nach Kjeldahl;

b) der Harnstoffstickstoff durch Erhitzen mit dem halben Volumen concentrirter Schwefelsäure während 3—4 Stunden auf 160—180° bestimmt.

Die Differenz zwischen 2a) und 2b) gibt den Amidosäurenstickstoff an.

Röhren 3—4 Stunden auf 160—180° erhalten werden müssen, die Zeit des Anwärmens also nicht mitgerechnet werden darf. Der Röhreninhalt wird in einen Kjeldahl-Destillirkolben gegossen und die Röhren der Reihe nach mit Wasser, dann mit wenig Natronlauge, um den an den Wandungen haftenden Niederschlag von phosphorwolframsaurem Ammon zu lösen, und schliesslich wiederum mit Wasser nachgespült. Beim Neutralisiren der Schwefelsäure sucht man einen grossen Ueberschuss an Lauge zu vermeiden; für 5 ccm. concentrirte Schwefelsäure genügen 20—22 ccm. 33%iger Natronlauge.

Was die Bedeutung der nach der beschriebenen Methode erhaltenen Werthe für (Harnstoff + Amidosäuren) N, Harnstoff-N und Amidosäuren-N betrifft, so ist zu bemerken, dass im Harne ausser Harnstoff und Amidosäuren noch einige andere stickstoffhaltige Körper vorkommen, welche durch Phosphorwolframsäure nicht oder nicht vollständig gefällt werden. Da jedoch die Angaben hierüber in der Litteratur zum Theil einander widersprechen, so ist eine Nachprüfung des Verhaltens von Phosphorwolframsäure gegen die normal und pathologisch im Harn vorkommenden stickstoffhaltigen Körper wünschenswerth. Jedenfalls ist sicher, dass alle im Phosphorwolframsäurefiltrate vorhandenen stickstoffhaltigen Verbindungen beim Erhitzen mit Schwefelsäure der genannten Concentration auf 160° in Ammoniak und eventuell Amidosäuren zerfallen müssen. Der nach unserer Methode erhaltene Werth für Amidosäurenstickstoff gibt daher thatsächlich nur diesen Stickstoff an, es bleibt aber noch zu entscheiden, ob derselbe in seiner Gesamtheit schon vorgebildet im Harne vorhanden war oder erst bei der Spaltung durch Schwefelsäure aus anderen Körpern entstanden ist.

Wir haben mit der beschriebenen Methode zunächst eine Reihe von normalen und pathologischen Harnen untersucht, vor Allem war zu ermitteln, in wie weit bei Bestimmung des Harnstoffstickstoffes durch Erhitzen mit Schwefelsäure die gefundene Menge abhängig ist von der Temperatur und der Zeit des Erwärmens. Es ergab sich, dass bei Temperatur-

schwankungen von 155—190° und bei Zeitschwankungen von 4—10 Stunden stets dieselben Werthe erhalten wurden. Hier folgen einige Resultate :

Patient	Ges. N	( $\bar{U} + A$ )N	$\bar{U}N$	AN	$\bar{U}N$ in % vom Ges. N	AN in % vom Ges. N
G.	0,985 g	0,794 g	0,768 g	0,026 g	78%	2,7%
		23,80; 23,95 und 23,83 ccm.				
L.	0,562 g	0,499 g	0,485 g	0,014 g	86,3%	2,5%
		17,35 und 17,30 ccm.				
Schw.	0,449 g	0,311 g	0,257 g	0,054 g	57,2%	12,0%
		7,67 und 7,65 ccm.				

Die Bezeichnungen ( $\bar{U} + A$ )N und AN bedeuten (Harnstoff + Amidosäuren-)N und Amidosäurenstickstoff. Die unter den Werthen für Harnstoffstickstoff angegebenen und von einer geschweiften Klammer umfassten Zahlen geben die Anzahlen von Cubikcentimetern  $\frac{1}{10}$  N.-Säure an, welche bei Bestimmung des Harnstoffstickstoffes erhalten wurden. Wie ersichtlich, differiren die Zahlen trotz der Schwankungen in der Temperatur und Erhitzungsdauer innerhalb der angegebenen Grenzen nur um höchstens 0,15 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Säure.

Die Ausscheidung der Amidosäuren, welche nach den bisherigen Erfahrungen beim normalen Individuum abhängig von der Nahrung ist, wird bei gleicher Nahrung ebenso wie die aller anderen stickstoffhaltigen Verbindungen einen nahezu constanten Werth haben müssen. Eine brauchbare Methode zur Bestimmung der Amidosäuren muss dies zum Ausdruck bringen; ebenso muss sie eine Vermehrung der Amidosäuren in den Fällen nachweisen, wo eine solche mit Sicherheit constatirt ist, wie nach Eingabe bestimmter Medicamente.

Wir haben daher mit unserer Methode zunächst bei einem Hunde, welcher nur mit Fleisch gefüttert wurde, die Ausfuhr an Amidosäurenstickstoff verfolgt und dann bei gleichbleibender Ernährung 3 Tage hintereinander bestimmte Mengen an Glycocoll gegeben, um festzustellen, ob thatsächlich alles Glycocoll, wie angenommen wird, in Harnstoff übergeht.

Menge	Ges. N	$\frac{+}{U+A}N$		$\frac{+}{UN}$	AN	$\frac{+}{UN} \quad \frac{+}{AN}$		Bemerkungen
		in % des Ges. N						
470 ccm.	14,65 g	13,16 g	12,87 g	0,29 g	87,8%	2,0%		
335 »	9,59 »	8,65 »	8,38 »	0,27 »	87,4%	2,8%		
315 »	10,95 »	10,05 »	9,72 »	0,33 »	88,7%	3,0%		
542 »	10,20 »	9,44 »	8,92 »	0,52 »	87,4%	5,1%	Harn nach 6 g Glycocoll	
710 »	13,00 »	11,90 »	11,40 »	0,50 »	87,7%	3,8%	» » 12 g	»
325 »	12,82 »	11,58 »	10,94 »	0,64 »	85,3%	5,0%	» » 18 g	»
250 »	7,27 »	6,75 »	6,50 »	0,25 »	89,4%	3,4%		

Die tägliche Ausscheidung an Amidosäurenstickstoff beträgt bei unserem Hunde nach Fleischfütterung 0,29 g, 0,27 g, und 0,33 g an 3 aufeinander folgenden Tagen. Dieselbe steigt in geringer Weise, doch deutlich an, nach Eingabe von Glycocoll und zwar auf 0,52 g, 0,50 g und 0,64 g. Hiernach scheint ein geringer Theil des Glycocolls unverändert — ob vielleicht gepaart mit einer Säure, muss selbstverständlich dahingestellt bleiben — den Organismus zu passiren; dieser Theil wächst jedoch nicht proportional der Einfuhr an Glycocoll.

Bei einem am Menschen ausgeführten Versuche sollte festgestellt werden, ob der Uebergang von Benzoesäure in Hippursäure durch Zunahme des ausgeführten Amidosäurenstickstoffs mit unserer Methode zum Ausdruck käme. Der Patient, ein 15jähriger Junge im Gewichte von rund 42 Kilo, erhielt täglich an Nahrung: 2 Eier, 100 g Wurst oder Schinken, 60 g Butter, 200 g Milchreis, 320 g Brod und Semmel,  $\frac{1}{2}$  Liter Bier und 1 Liter Kaffee. Am 7. und 8. Tage nahm er 1,5 g, resp. 2, 1,5 g Natriumbenzoat.

#### Versuch am Menschen.

Menge	Ges. N	$\frac{+}{UN}$		AN	$\frac{+}{UN} + \frac{+}{AN} = \frac{+}{(U+A)N}$		Bemerkungen
		in % vom Ges. N					
1045 ccm.	7,15 g	5,28 g	0,397 g	73,8%	+	5,5% = 79,3%	
1185 >	6,25 >	4,57 >	0,339 >	73,1%	+	5,4% = 78,5%	
780 >	6,69 >	4,75 >	0,399 >	71,0%	+	6,0% = 77,0%	
1250 >	7,45 >	5,51 >	0,450 >	73,9%	+	6,0% = 79,9%	
765 >	7,42 >	5,44 >	0,389 >	73,3%	+	5,2% = 78,5%	
925 >	6,55 >	4,82 >	0,325 >	73,6%	+	5,0% = 78,6%	

Harnmenge	Ges. N	$\overset{+}{UN}$	AN	$\overset{+}{UN} + AN = (\overset{+}{U} + A)N$	Bemerkungen
				in % des Ges. N	
615 ccm.	7,62 g	5,60 g	0,554 g	73,5% + 7,3% = 80,8%	Harn nach 1,5 g Benzoesäure
615 "	8,58 "	6,05 "	0,888 "	70,5% + 10,3% = 80,8%	" " 3,0 "
560 "	7,39 "	5,68 "	0,368 "	76,9% + 5,0% = 81,9%	
1075 "	9,02 "	6,97 "	0,290 "	77,3% + 3,2% = 80,5%	

Die absolute Ausscheidung an Amidosäurenstickstoff schwankte in unserem Falle zwischen 0,325 g und 0,45 g N, in Procenten vom Gesamtstickstoff ausgedrückt zwischen 5—6%. Nach Eingabe von 1,5 g, resp. 3 g Natriumbenzoat steigen die absoluten Werthe auf 0,554 g, resp. 0,888 g N, die procentischen auf 7,3%, resp. 10,3%. Unsere Methode zeigt daher in prompter Weise den Uebergang von Benzoesäure in Hippursäure an.

Es mag noch erwähnt werden, dass zur Ermittlung des Harnstoffstickstoffes stets 2 Analysen ausgeführt wurden. Wie weit dieselben übereinstimmen, mögen die folgenden Zahlen, welche die verbrauchten Cubikcentimeter  $\frac{1}{10}$  N.-Säure angeben, zeigen:

1. 12,43 und 12,59 ccm.	6. 19,77 und 19,67 ccm.
2. 14,90 " 15,1 "	7. 15,04 " 15,09 "
3. 14,36 " 14,28 "	8. 15,75 " 15,76 "
4. 16,95 " 16,90 "	9. 17,73 " 17,89 "
5. 13,79 " 13,75 "	



# Ueber die Farbenreactionen von Zuckern.

Von

Carl Neuberg.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 16. December 1900.)

---

Die Farbenreactionen (Furfurolreactionen) auf Kohlehydrate finden wegen der Leichtigkeit ihrer Anstellung ausgedehnte Anwendung, insbesondere macht die physiologische Chemie einen wichtigen Gebrauch von derselben bei dem Nachweis von Kohlehydratgruppen in Eiweisskörpern und complicirten Substanzgemischen, wo sie an Feinheit alle übrigen Proben weit übertreffen und oft das einzige brauchbare Reagens bilden.

Da diese Farbenreactionen nicht nur zur Erkennung von Kohlehydraten im Allgemeinen, sondern bis zu einem gewissen Grade auch zur Differenzirung einzelner Zuckerarten dienen, so ist die Frage nach ihrer Eindeutigkeit nicht unwichtig. Die natürlich vorkommenden Zuckerarten und Oxyaldehydsäuren sind bereits nach dieser Richtung hin geprüft, bei den synthetischen,<sup>1)</sup> besonders bei den niederen Gliedern dieser Gruppe steht eine solche Untersuchung noch aus und soll im Folgenden mitgetheilt werden.

Für den vorliegenden Zweck sind nur die vier wichtigsten

---

<sup>1)</sup> In der Natur sind diese Substanzen bisher nicht beobachtet, aber ihr Vorkommen erscheint durchaus nicht ausgeschlossen, zumal nahestehende Derivate derselben weit verbreitet sind, z. B. die Weinsäure, der Erythrit, das Glycerin, die Glycolsäure u. s. w. Wie leicht diese aber durch biologische Processe in Zuckerarten übergehen können, zeigen die Arbeiten von Bertrand (Compt. rend. de l'Acad. 129, 341) und Boutroux (Compt. rend. de l'Acad. 102, 924 und 127, 1224).

Farbenreactionen herangezogen, die Proben mit  $\alpha$ -Naphtol, Resorcin, Phloroglucin und Orcin.

Angestellt sind dieselben in der zur Zeit üblichen Art, die kurz beschrieben sei, da sie bisweilen etwas von der ursprünglich angegebenen Form verschieden ist.

#### I. $\alpha$ -Naphtolprobe von Molisch-Udránszky.<sup>1)</sup>

$\frac{1}{2}$  ccm. der verdünnten wässerigen Kohlehydratlösung wird mit einem Tropfen kaltesättigter alkoholischer  $\alpha$ -Naphtol-lösung versetzt und vorsichtig mit 1 ccm. concentrirter Schwefelsäure unterschichtet; an der Berührungsstelle beider Schichten tritt alsbald ein violetter Ring auf. (Sind Spuren von salpetriger Säure zugegen, so entsteht gleichzeitig ein hellgrüner Saum.) Bewirkt man nun durch Schütteln gleichmässige Mischung beider Schichten, wobei man durch Eintauchen in kaltes Wasser zu starker Erwärmung vorbeugt, so nimmt die Flüssigkeit einen rothen bis blavioletten Farbenton an und zeigt vor dem Spektroskop eine Totalabsorption des blauen und violetten Theils, sowie einen schmalen Streifen zwischen den Frauenhofer'schen Linien D und E, der alsbald verschwindet.

#### II. Resorcinprobe von Seliwanoff<sup>2)</sup>

Man erhitzt eine Spur der Zuckerlösung mit 2 ccm. eines Gemisches von rauchender Salzsäure und dem gleichen Volumen Wasser und fügt einige Krystalle Resorcin hinzu. Beim Erwärmen färbt sich die Flüssigkeit tiefroth und lässt allmählich einen braunrothen Farbstoff ausfallen, der sich in Alkohol wieder mit tiefrother Farbe löst.

#### III. Phloroglucinprobe von Tollens.<sup>3)</sup>

Zu einigen Cubikcentimetern rauchender Salzsäure fügt man soviel verdünnte wässrige Zuckerlösung, dass der Salzsäuregehalt der Flüssigkeit ungefähr gleich dem einer Säure

---

1) Molisch, Wien, Monatshefte f. Chemie, 7, 198.

v. Udránszky, diese Zeitschrift, Bd. XII, S. 358.

2) Seliwanoff, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 20, 181.

3) Tollens und seine Mitarbeiter, Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 22, 1046; 29, 1202. Ann. d. Chem., 254, 329; 260, 304.

soviel Phloroglucin hinzu, dass in der Wärme etwas ungelöst bleibt. Beim Erhitzen tritt bald eine kirschrothe Färbung auf und allmählich scheidet sich ein dunkler Farbstoff ab. Nach dem Erkalten schüttelt man diesen<sup>1)</sup> am besten mit Amylalkohol aus; die rothe amyalkoholische Lösung zeigt vor dem Spektroskop einen Absorptionsstreifen in der Mitte zwischen D und E.

#### IV. Orcinprobe von Tollens.<sup>2)</sup>

Beim Erwärmen der Zuckerlösung mit etwas Orcin und soviel Salzsäure, dass der Gehalt an derselben in der Flüssigkeit ungefähr 18% beträgt, treten nach einander erst Roth-, dann Violett- und schliesslich Blaugrünfärbung auf und bald beginnt die Abscheidung blaugrüner Flocken. Man löst auch diese nach E. Salkowski am besten in Amylalkohol zu einer blaugrünen Flüssigkeit, die einen Absorptionsstreifen zwischen C und D zeigt, derart, dass ein Theil des Gelb noch sichtbar bleibt.

Die Erfahrungen, die man bisher mit den angegebenen Reactionen in der beschriebenen Form gemacht, sind folgende:

I. Die  $\alpha$ -Naphtolprobe wird in mehr oder minder schöner Weise von allen Kohlehydraten gegeben, die daraufhin geprüft sind.

II. Die Resorcinprobe fällt positiv aus nur mit den Ketosen Galtose<sup>3)</sup>, Tagatose,  $\phi$ -Tagatose, Sorbose und Fruchtzucker oder mit den Polysacchariden, die bei der Hydrolyse Fructose liefern, wie Rohrzucker und Raffinose.

III. und IV. Die Phloroglucin- und Orcinreaction gelten als charakteristisch für Pentosen und die Pentosencarbonsäure Glucuronsäure, resp. für Verbindungen, die durch Hydrolyse diese Produkte liefern, d. h. die Pentosane und die gepaarten Glucuronsäuren.<sup>4)</sup>

1) E. Salkowski, Centralbl. f. d. med. W., 1892, Nr. 32.

2) Tollens, Ann. d. Chem., 260, 395.

3) Lobry de Bruyn u. A. van Ekenstein, Rec. des trav. chim. des Pays-Bas, 16, 262.

4) Ueber das Verhalten der gepaarten Glucuronsäuren im Harn bei der Orcin- u. Phloroglucinprobe siehe: E. Salkowski, Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 514 u. 517; F. Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Medic., 37,

Auf ihr Verhalten bei den erwähnten vier Farbenreactionen sind nun folgende Substanzen aus der Zuckergruppe untersucht: Glycolaldehyd, Glycerinaldehyd, Glycerose, l-Erythrose, i-Tetrose, d-Lyxose, d-Oxygluconsäure, Aldehydschleimsäure und Formose.

Soweit sie bekannt, sind alle diese Körper in reiner wässriger Lösung zur Anwendung gekommen. Ueber ihre Darstellung sei Folgendes bemerkt:

Glycolaldehyd wurde nach der Angabe von Fenton<sup>1)</sup> aus Weinsäure über Hydroxymaleinsäure bereitet und in ca. 5%iger Lösung geprüft.

Glycerinaldehyd wurde nach der Vorschrift von Wohl und Neuberg<sup>2)</sup> aus Acrolein dargestellt und in ca. 5%iger Lösung untersucht.

Glycerose wurde auf zwei verschiedenen Wegen gewonnen: a) nach der älteren Vorschrift von Fischer und Tafel<sup>3)</sup> aus Glycerin und Natriumhypobromit; b) nach den späteren Angaben derselben Autoren<sup>4)</sup> durch Einwirkung von Bromdampf auf Bleiglycerat. Beide Produkte zeigen entsprechend ihrer verschiedenen Zusammensetzung etwas abweichendes Verhalten. Beide wurden in wässriger Lösung untersucht, die ca. 5% reducirende Substanz, als Traubenzucker titirt, enthielt.

l-Erythrose wurde nach Wohl's<sup>5)</sup> Vorschrift aus l-Erythrosediacetamid dargestellt. Für Ueberlassung der letzten Verbindung bin ich Herrn Prof. A. Wohl zu bestem Danke verpflichtet. Benutzt wurde eine Lösung von ca. 5%.

i-Tetroselösung wurde aus i-Erythrit mit Brom und Soda nach der Vorschrift bereitet, die Fischer und Tafel für die Glycerose (l. c.) angegeben haben. Die Ausbeute ist,

---

Heft 5 u. 6; P. Mayer, Berl. klin. Wochenschr., 1900, Nr. 1; Mayer und Neuberg, Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 265.

1) Chem. News, 72, 47 u. Journ. chem. soc. London, 67, 774.

2) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 33, 3095.

3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 20, 3384.

4) „ „ „ „ 21, 2634.

5) „ „ „ „ 32, 3669.

wurde, so besser, als bei der Oxydation mittelst Salpetersäure.<sup>1)</sup>  
d-Lyxose verdanke ich der Liebenswürdigkeit des Herrn Ollendorff, der sie nach der Methode von Ruff und Ollendorff<sup>2)</sup> aus Galactonsäure dargestellt hat. Untersucht wurde eine 0,5%ige Lösung.

d-Oxygluconsäure gewann ich nach Ruff's Vorschrift<sup>3)</sup> mittelst Wasserstoffsuperoxyd aus Gluconsäure. Durch Zerlegung des Kalksalzes mit Oxalsäure wurde eine 2%ige Lösung bereitet.

Aldehydschleimsäure stellte ich nach Fischer's Vorschrift<sup>4)</sup> durch Reduction des Schleimsäurelactons mit Natriumamalgam dar. Durch Zerlegung des in Wasser suspendirten basischen Bleisalzes mit H<sub>2</sub>S erhielt ich eine ca. 3%ige Lösung.

Formose<sup>5)</sup> wurde nach der Vorschrift von O. Löw durch Condensation einer 4%igen Formaldehydlösung mittels Kalk gewonnen und direkt als Rohprodukt untersucht.

Das Verhalten der angeführten Substanzen bei den erwähnten vier Farbenreactionen, das am Ende der vorliegenden Mittheilung in einer Tabelle zusammengestellt ist, ist folgendermassen:

I. Die Molisch-Udránszky'sche Reaction wird in Uebereinstimmung mit den Erfahrungen, die an den natürlich vorkommenden Zuckern und Oxyaldehydsäuren gemacht sind, mit allen untersuchten Substanzen erhalten.

II. Die Resorcinprobe fällt bei der Glycerose, der i-Tetrose, der Formose und der d-Oxygluconsäure positiv aus.

Die Glycerose besteht nach den Untersuchungen von Fischer und Tafel,<sup>6)</sup> Piloty,<sup>7)</sup> Wohl und Neuberg<sup>8)</sup> im Wesentlichen aus Dioxyceton, das man aus Glycerin durch

---

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 20, 1090.

2) „ „ „ „ „ 33, 1799.

3) „ „ „ „ „ 32, 2269.

4) „ „ „ „ „ 23, 937 u. 24, 2142.

5) Journ. f. prakt. Chem. (II), 33, 321 u. 37, 203.

6) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., 22, 106.

7) „ „ „ „ „ 30, 3161.

8) „ „ „ „ „ 33, 3098.

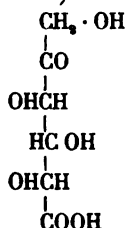
Einwirkung des Sorbosebacteriums nach Bertrand's Versuchen<sup>1)</sup> rein erhält.

Der oxydirte i-Erythrit (i-Tetrose) enthält nach allen bisherigen Erfahrungen eine inactive Ketotetrose, deren eine Componente, die d-Erythrulose,<sup>2)</sup> Bertrand ebenfalls mit Hülfe des Sorbosebacteriums aus i-Erythrit rein gewonnen hat.

Die Formose von Löw enthält ungefähr 3—4% sogenannte Methose,<sup>3)</sup> die nach Fischer's Untersuchungen<sup>4)</sup> identisch mit  $\alpha$ -Acrose = r-Fructose ist.

Diese Resultate zeigen, dass allgemein Ketosen eine positive Seliwanoff'sche Probe geben, die deshalb mit Recht den Namen «Ketosenreaction» führt.

Interessant ist, dass auch die d-Oxygluconsäure diese Reaction zeigt. Sie ist aller Wahrscheinlichkeit nach identisch mit dem von Boutroux<sup>5)</sup> durch Pilzwachsthum aus Gluconsäure erhaltenen Produkt. Die Erfahrung, dass derartige biochemische Processe die Ketosenbildung bevorzugen, erfährt in diesem Falle durch die Seliwanoff'sche Probe eine Bestätigung, gleichzeitig findet die von Boutroux aufgestellte Constitutionsformel (Ketosäure)



eine Stütze.

III. Die Phloroglucinreaction tritt mit Ausnahme des Glycolaldehyds bei allen untersuchten Substanzen ein, aber mit sehr verschiedener Stärke.

1) Compt. rend. de l'Acad., 126, 842 u. 984; 129, 341.

2) Compt. rend. de l'Acad., 130, 1330 u. 1472 u. Bull. Soc. Chim., Paris [8], 23, 681.

3) Ber. d. deutsch. chem. Ges., 22, 475.

4) Ber. d. deutsch. chem. Ges., 23, 386 u. 2127.

5) Compt. rend., 102, 924; 111, 185; 127, 1224 u. Ann. de Chimie et Phys., [VI] 21, 585.

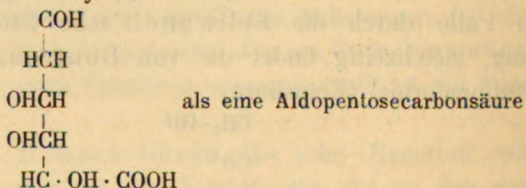


Probe nur bei langem Kochen und bei Anwendung grösserer Materialmengen, als üblich, positiv aus, die mit Natriumhypobromit bereitete Glycerose lässt überhaupt keinen Absorptionsstreifen erkennen.

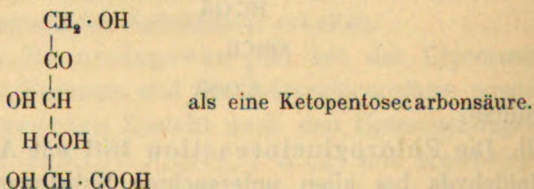
l-Erythrose und i-Tetrose geben zwar eine schöne Rosafärbung, doch bleibt der charakteristische Absorptionsstreifen auch bei längerem Erhitzen und ziemlich viel Substanz nur schwach, bei der l-Erythrose häufig nur angedeutet.

Die d-Lyxose dagegen gibt genau wie die bisher untersuchten Pentosen, die l-Arabinose und l-Xylose, die Reaction in typischer Weise.

Ebenso verhalten sich d-Oxygluconsäure und Aldehydschleimsäure, die ja der Glucuronsäure isomer sind und wie diese als Pentosecarbonsäuren aufgefasst werden können, und zwar die Aldehydschleimsäure:



und die d-Oxygluconsäure:



Die Thatsache, dass auch die Formose die Phloroglucinreaction gibt, findet wohl darin eine genügende Erklärung, dass «Formose» ein Gemisch verschiedener synthetischer Kohlehydrate darstellt, unter denen sich auch eine Pentose befindet, wie Fischer<sup>1)</sup> aus den Analysen der entstehenden Osazone wahrscheinlich gemacht hat.

<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges. 21, 990.

IV. Die Orcinreaction schliesslich fällt bei dem Glycolaldehyd und den Tetrosen absolut negativ aus. Die letzteren geben zwar einen grünen Niederschlag, der auch in den Amylalkohol mit hellgrüner Farbe übergeht, aber der charakteristische Absorptionsstreifen ist nicht vorhanden.

Der Glycerinaldehyd gibt dagegen die Orcinreaction mit derselben Schönheit wie eine Pentose. Die Grünfärbung des Amylalkoholauszugs ist ausserordentlich intensiv, der Absorptionsstreifen sehr kräftig, so dass er bei nicht gehöriger Verdünnung beiderseitig verbreitert erscheint.

Glycerose aus Bleiglycerat verhält sich wie Glycerinaldehyd, mittelst Natriumhypobromit gewonnene zeigt die Reaction schwächer.

d-Lyxose, d-Oxygluconsäure, Aldehydschleimsäure und Formose zeigen die Orcinreaction in typischer Weise aus Gründen, die bei der Phloroglucinprobe dargestellt sind.

Die Zusammenstellung der Resultate zeigt, dass die gebräuchlichsten Farbenreactionen der Kohlehydrate nicht jene Eindeutigkeit besitzen, die man ihnen bisher beigelegt hat, und dass deshalb bei ihrer Benutzung eine gewisse Vorsicht angebracht erscheint.

Von den beiden wichtigsten Farbenreactionen, den Pentosenproben, ist die Orcinreaction eindeutiger als die Phloroglucinprobe, da sie nur von den Pentosen, ihren Carbonsäuren und den Triosen gegeben wird. Erstere besitzt daher vor der letzteren den Vorzug, den ihr E. Salkowski auch aus anderen Gründen<sup>1)</sup> zuerkannt hat.

Die mitgetheilten Ergebnisse werfen auch ein Licht auf die Frage, wie diese Farbenreactionen der Zucker zu Stande kommen, ob sie ihren Namen «Furfuolreactionen» mit Recht führen, ob die Farbstoffbildung wirklich auf einer Furfuolabspaltung beruht.

Die  $\alpha$ -Naphtolprobe tritt allerdings mit Furfuol ein, die Orcinreaction nicht oder nur schwach; die Probe mit Phloro-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 517.



kann Furfurol kaum am Zustandekommen dieser drei letzten Reactionen<sup>1)</sup> theilhaftig sein. Aber auch aus anderen Gründen erscheint die Annahme einer Furfurolbildung durchaus fragwürdig. Denn einmal ist es unverständlich, warum unter so ähnlichen Verhältnissen (Behandlung mit mässig concentrirten Säuren) bald immer ( $\alpha$ -Naphtholprobe), bald nur in besonderen Fällen (Phloroglucin- und Orcinprobe) Furfurol entstehen soll, ferner liesse sich eine Bildung von Furfurol aus den niederen Zuckern (Glycolaldehyd und Triosen) nur gezwungen deuten. Gegen die Auffassung als «Furfurolreaction» sprechen auch die Beobachtungen von Tollens<sup>2)</sup> und Tollens und Krüger,<sup>3)</sup> dass die Oxycellulosen bei der Behandlung mit verdünnter Salzsäure zwar reichlich Furfurol liefern, aber keine Phloroglucinreaction geben. Viel wahrscheinlicher scheint die Annahme, dass die Farbstoffbildung auf einer Condensation der angewandten Phenole (Naphthol, Phloroglucin, Orcin etc.) mit den Humussäuren beruht, die nach den Untersuchungen von Berthelot und André<sup>4)</sup> aus allen Kohlehydraten entstehen. Für diese Auffassung spricht auch ein Versuch von Tollens,<sup>5)</sup> dass der durch Zersetzung von 500 g Rohrzucker entstehende Humus sich mit 150 g Phenol zu verbinden vermag.

#### Tabellarische Uebersicht.

Probe mit:	$\alpha$ -Naphthol	Resorcin	Phloroglucin	Orcin
Glycolaldehyd . . . . .	positiv	negativ	negativ	negativ
Glycerinaldehyd . . . . .	positiv	negativ	positiv (schwach)	positiv

1) Bei den Ketoheptosen könnte man die Farbstoffbildung mit ihrem leichten Uebergang in  $\beta$ -Oxy-  $\delta$ -Methylfurfurol (Ch. Ztg., 19, 1008) in Verbindung bringen. Beim Dioxyaceton und der Ketotetrose hingegen kann man sie hierauf nicht zurückführen.

2) Ann., 286, 301.

3) Zeitschr. f. angew. Ch., 1896, S. 46.

4) Compt. rend. de l'Acad., 123, 567 u. 625.

5) Chem. Ztg., 11, 77.

	$\alpha$ -Naphtol	Resorcin	Phloro- glucin	Orcin
Glycerose { a) mit NaOH bereitet .	positiv	positiv	negativ	positiv
b) aus Bleiglycerat . .	positiv	positiv	positiv (schwach)	positiv
l-Erythrose . . . . .	positiv	negativ	positiv (schwach)	negativ
i-Tetrose . . . . .	positiv	positiv	positiv (schwach)	negativ
d-Lyxose . . . . .	positiv	negativ	positiv	positiv
d-Oxygluconsäure . . . . .	positiv	positiv	positiv	positiv
Aldehydschleimsäure . . . . .	positiv	negativ	positiv	positiv
Formose . . . . .	positiv	positiv	positiv	positiv

# Ueber den Nachweis der Bernsteinsäure.

Von  
Carl Neuberg.

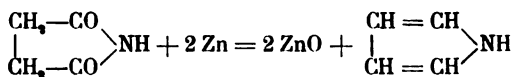
(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)  
(Der Redaction zugegangen am 16. December 1900.)

Der übliche Nachweis von Bernsteinsäure beruht auf der Reindarstellung der Säure und deren Identificirung durch Schmelzpunkt oder Verwandlung in das charakteristische Bleisalz.

Diese Methode hat das Vorhandensein grösserer, greifbarer Mengen der Substanz zur Voraussetzung und versagt demnach bei geringen Quantitäten.

Die Erkennung solcher lässt sich nun in sehr einfacher Weise auf die so überaus empfindliche Pyrrolreaction<sup>1)</sup> gründen.

Im Jahre 1880 zeigte C. A. Bell,<sup>2)</sup> dass Bernsteinsäuremid durch Glühen mit Zinkstaub nach der Gleichung:



in Pyrrol übergeht.

Wie zu erwarten war, ergaben Versuche, dass sich Ammoniumsuccinat und demgemäss Lösungen von Bernsteinsäure in überschüssigem Ammoniak genau wie Succinimid verhalten, d. h. beim Erhitzen mit Zinkstaub Pyrrol liefern; dieses gibt sich in minimalster Menge durch eine allmählich

<sup>1)</sup> Runge, Poggendorff's Annalen 31, 67.

<sup>2)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges. 13, 877.

sich vertiefende Rothfärbung zu erkennen, die es einem mit Salzsäure benetzten Fichtenspähne ertheilt.

Die Empfindlichkeit dieser Reaction ist ziemlich beträchtlich, da 1 ccm. einer  $\frac{1}{100}$ -Normalbernsteinsäure = 0,0006 g reiner Bernsteinsäure noch die Färbung mehrerer Fichtenspähne gestattet.

Die Anstellung der Probe ist überaus einfach. Man engt die auf Bernsteinsäure zu untersuchende Flüssigkeit nach Zusatz von einigen Cubikcentimetern Ammoniaklösung im Reagensglase auf etwa 1 ccm. ein, fügt dann etwa 1 g käuflichen Zinkstaub hinzu, der die Flüssigkeit aufsaugt und eine gleichmässige Vertheilung derselben bewirkt, und glüht. Die entweichenden Dämpfe färben dann bei Anwesenheit von Bernsteinsäure, entsprechend deren Menge, Fichtenspähne (Streichhölzer) hell- oder dunkelroth, wenn diese, mit starker Salzsäure befeuchtet, in die Reagensglasöffnung gehängt werden. Dabei ist die Vorsicht zu gebrauchen, die Fichtenspähne erst nach Vertreibung des überschüssigen Ammoniaks in die Dämpfe einzuführen, um eine Neutralisation der Salzsäure zu vermeiden.

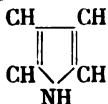
Beindet sich die Bernsteinsäure in der zu untersuchenden Flüssigkeit nicht als freie Säure, sondern an Metall gebunden, so lässt sie sich in vielen Fällen (Erdalkali- und Schwermetallsalz) genau ebenso nachweisen, wenn man statt des Ammoniaks Ammoniumcarbonat anwendet. Ganz sicher gelingt ihre Auffindung, wenn man die Umwandlung in das Ammonsalz durch Ammoniumphosphat bewirkt, indem man zu der mit Ammoniak auf ein kleines Volumen eingedampften Flüssigkeit vor Zugabe des Zinkstaubs einige Krystalle von phosphorsaurem Ammonium fügt.

Ebenso lässt sich der Nachweis von Bernsteinsäure in Niederschlägen (Silbersalz) führen, indem man unbekümmert um etwaige feste Ausscheidungen genau nach der gegebenen Vorschrift verfährt.

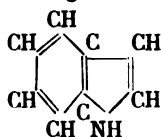
Die mitgetheilte Prüfung auf Bernsteinsäure ist ausserordentlich empfindlich und durchaus charakteristisch, solange keine Substanzen zugegen sind, die gleichfalls die Fichtenspahnreaction geben.

einer Reihe von Körpern, die sich in folgende Gruppen einordnen:

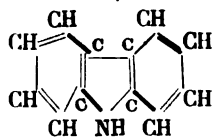
### I. Pyrrolgruppe.

Ausser Pyrrol  und seinen Derivaten entwickeln

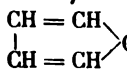
Verbindungen mit condensirtem Pyrrolkern, wie Indol



und Carbazol



samt ihren Homologen direkt beim Erhitzen Dämpfe, die einen mit Salzsäure getränkten Fichtenspahn röthen. Hierhin gehören auch die Eiweisskörper, die ja eine Indolgruppe enthalten und als deren Spaltungsprodukt auch Pyrrol auftritt.

II. Die  $\gamma$ -Diketone  $R-CO-CH_2-CH_2-CO-R$  sowie Furan  und seine Derivate gehen beim Erwärmen mit Ammoniak, resp. mit Chlorzinkammoniak oder Chlorcalciumammoniak leicht in Pyrrolabkömmlinge über und gaben dann die Fichtenspahnreaction.

III. Eine Reihe von Säuren geben beim Erhitzen ihrer Ammoniumsalze oder als Amidosäuren direkt Pyrrol, so die Schleimsäure und die isomere Zuckersäure  $\begin{array}{c} CH \cdot OH - CH \cdot OH - COOH \\ | \\ CH \cdot OH - CH \cdot OH - COOH \end{array}$

sowie die Glutaminsäure  $\begin{array}{c} CH_2 - CH < COOH \\ | \\ CH_2 - COOH \end{array}$

IV. Ammoniumsalze, Amide und Imide einiger mehrbasischer Säuren, die wie die Körper der Gruppe II und III die Atomanordnung  $\begin{array}{c} C - C - \\ | \\ C - C - \end{array}$  besitzen, liefern beim Erhitzen und gleichzeitiger Reduction mittels Zinkstaubs fichtenspahn-röthende Dämpfe, so die Bernsteinsäure, Aepfelsäure, Weinsäure, Asparaginsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Citronensäure, Aconitsäure, Tricarallylsäure etc.

V. Schliesslich entsteht Pyrrol auch aus Hämin beim Erhitzen mit Zinkstaub.

Aus der Zahl der Substanzen, welche die Pyrrolreaction geben, kommen für die thier-physiologische Untersuchung ausser Bernsteinsäure nur Albumin, Hämin und Indolderivate in Betracht. Aber auch bei Gegenwart dieser Körper lässt sich mittels der Fichtenspahnreaction die Bernsteinsäure eindeutig und scharf erkennen, da sie sich leicht von ihnen trennen lässt.

Die Scheidung der Bernsteinsäure von Albumin und Hämin erfolgt am einfachsten durch Aether, indem man das zu untersuchende Object 3 bis 4 mal in schwach schwefelsaurer Lösung mit Aether extrahirt. Dieser nimmt zuweilen, wenn er alkoholhaltig ist, ausser der Bernsteinsäure aus der sauren Lösung etwas Hämin auf. Dasselbe wird aber durch Eindampfen der vereinigten Aetherauszüge unlöslich; der Rückstand gibt an reinen trockenen Aether nur Bernsteinsäure ab, die nach Abdunsten des Lösungsmittels in minimalster Menge durch die beschriebene Reaction erkannt wird.

Die Trennung von Bernsteinsäure und Indolbasen,<sup>1)</sup> die gleichfalls in den Aether übergehen, kann in alkalischer Lösung durch Wasserdampf erfolgen, der in kurzer Zeit Indol und Homologe mit fortführt.<sup>2)</sup>

Die Erkennung von Bernsteinsäure neben Albumin, Hämin und Indolderivaten bietet um so weniger Schwierigkeiten, als man auf die beiden letzten Substanzen durch Herkunft, Farbe und Geruch des Untersuchungsobjects meist vorbereitet ist.

Der Gang der Prüfung ist folgender:

Um die eventuell an Basen gebundene Bernsteinsäure

---

1) Indol und Skatol sind sehr schwache Basen von vollkommenem Kohlenwasserstoffcharakter. Sie bilden wie ihre Muttersubstanz, das Pyrrol, nur mit Pikrinsäure ein Salz und gehen daher aus mineralsaurer Lösung in Aether über.

2) Skatolcarbonsäure und Skatolelessigsäure sind nicht mit Wasserdampf flüchtig; sie können aber in Form ihrer unlöslichen Nitrosoderivate aus der Lösung entfernt werden. (E. Salkowski, Diese Zeitschrift, Bd. IX, S. 24 u. XXVII, S. 303. M. Nencki, Wiener Monatshefte 10, 516.

mit verdünnter Schwefelsäure an und schüttelt dann 3 bis 4 mal mit Aether aus. Der Abdampfrückstand der vereinigten Aetherauszüge enthält dann die Bernsteinsäure eventuell neben Indolderivaten und Spuren von Hämin.

Die Anwesenheit der beiden letzten Substanzen erkennt man am schnellsten daran, dass eine Probe direkt beim Erhitzen (Indolabkömmlinge) oder nach Zusatz von Zinkstaub (Hämin) die Fichtenspahnreaction gibt.

Ergibt sich hierbei die Abwesenheit von Hämin und Indolderivaten, so prüft man direkt mit Ammoniak und Zinkstaub auf Bernsteinsäure; anderenfalls müssen jene störenden Substanzen zuvor entfernt werden.

Zur Trennung von Hämin nimmt man den trockenen Aetherrückstand noch einmal mit wasserfreiem Aether auf, filtrirt und verdunstet. Der Rückstand ist jetzt frei von Hämin.

Zur Entfernung von Indolderivaten versetzt man die Flüssigkeit mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaction und leitet kurze Zeit einen Dampfstrom hindurch. Wenn nach einigen Minuten eine Probe der Flüssigkeit oder bei Verwendung eines Kühlers das Destillat keine fichtenspahnröthenden Dämpfe mehr beim Erhitzen entwickelt, so sind Indol und Homologe fortgeführt, und man prüft nun die Flüssigkeit nach Neutralisation mittels Schwefelsäure und Zusatz von Ammoniak, Ammoniumphosphat und Zinkstaub auf Bernsteinsäure.

---

Die beschriebene Methode zum Nachweis der Bernsteinsäure ist in gleicher Weise mit festem und flüssigem Material ausführbar. Ihr Vorzug vor dem alten, auf Reindarstellung der Säure beruhenden Verfahren liegt besonders darin, dass sie mit ausserordentlich viel geringeren Substanzmengen ausführbar ist.

---

# HOPPE-SEYLER'S ZEITSCHRIFT

für

## PHYSIOLOGISCHE CHEMIE

unter Mitwirkung von

Prof. G. v. BUNGE in Basel, Prof. EMIL FISCHER in Berlin, Prof. O. HAMMARSTEN in Upsala, Prof. G. HOPPE-SEYLER in Kiel, Prof. HÜFNER in Tübingen, Prof. HUPPERT in Prag, Prof. JAFFÉ in Königsberg, Privatdozent Dr. Fr. KUTSCHER in Marburg, Prof. E. LUDWIG in Wien, Prof. NENCKI in St. Petersburg, Prof. W. OSTWALD in Leipzig, Prof. C. A. PEKELHARING in Utrecht, Prof. E. SALKOWSKI in Berlin, Prof. E. SCHULZE in Zürich und Prof. H. THIERFELDER in Berlin

herausgegeben von

**A. KOSSEL,**

Professor der Physiologie in Heidelberg.

---

**ZWEIUNDDREISSIGSTER BAND.**

---

Mit vier Abbildungen.

---

**STRASSBURG**

**VERLAG VON KARL J. TRÜBNER**

**1901.**





# Inhalt des zweiunddreissigsten Bandes.

## HEFT I und II.

(Ausgegeben am 16. März 1901.)

Seite

<b>Butkewitsch, Wl.</b> Ueber das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekeimten Samen und über seine Wirkung . . .	1
<b>Haslam, H. C.</b> Quantitative Bestimmung der Hexonbasen in Heteroalbumose und Pepton . . . . .	54
<b>Kutscher, Fr.</b> Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe . . . . .	59
<b>Bang, Ivar.</b> Eine Bemerkung zu der Abhandlung Kossel's und Kutscher's über die Eiweisskörper . . . . .	79
<b>Kossel, A.</b> Antwort auf die vorhergehende Bemerkung des Herrn Bang	81
<b>Bouma, Jac.</b> Ueber die Bestimmung des Harnindicans als Indigoroth mittelst Isatinsalzsäure . . . . .	82
<b>Emlden, Gustav.</b> Ueber den Nachweis von Cystin und Cystein unter den Spaltungsprodukten der Eiweisskörper . . . . .	94
<b>Krüger, Martin, und Julius Schmid.</b> Der Einfluss des Caffeins und Theobromins auf die Ausscheidung der Purinkörper im Harne	104
<b>Lawrow, D.</b> Ueber die Ausscheidung des Antipyrins aus dem thierischen Organismus . . . . .	111
<b>Oswald, A.</b> Zur Kenntniss des Thyreoglobulins . . . . .	121
<b>Huiskamp, W.</b> Ueber die Eiweisskörper der Thymusdrüse . . . . .	145
<b>Kurajeff, D.</b> Ueber das Protamin aus den Spermatozoen des Accipenser stellatus . . . . .	197

## HEFT III und IV.

(Ausgegeben am 27. April 1901.)

<b>Bang, Ivar.</b> Chemische und physiologische Studien über die Guanylsäure. II. Theil: Physiologische Studien. Mit vier Abbildungen . . . . .	201
<b>Saito, S., und K. Katsuyama.</b> Beiträge zur Kenntniss der Milchsäurebildung im thierischen Organismus bei Sauerstoffmangel . . . . .	214
— — Ueber den Zucker im normalen Hühnerblute . . . . .	231
<b>Katsuyama, K.</b> Ueber den Einfluss einiger harntreibenden Mittel auf die Ausscheidung von Alkalien im Harne. II. Mittheilung	235
<b>Steudel, H.</b> Die Constitution des Thymins . . . . .	241
<b>Salkowski, E.</b> Ueber die Paranucleinsäure aus Casein I . . . . .	245
<b>Schulz, Fr. N., und J. Mainzer.</b> Ueber den Verlauf der Phosphorsäureausscheidung beim Hunger . . . . .	268
<b>Bénech, E., und Fr. Kutscher.</b> Die Oxydationsprodukte des Arginins. I. Mittheilung . . . . .	278
<b>Levene, P. A.,</b> Ueber das Ichthulin des Kabeljau . . . . .	281
<b>Steudel, H.</b> Das Verhalten einiger Pyrimidinderivate im Organismus . . . . .	285

<b>Lang, S.</b> Ueber die Stickstoffausscheidung nach Leberexstirpation	320
<b>Hedin, S. G., und S. Rowland.</b> Ueber ein proteolytisches Enzym in der Milz . . . . .	341
<b>Ehrström, Robert.</b> Ueber ein neues Histon aus Fischsperma . .	350
<b>Sundwik, Ernst Edw.</b> Ueber Psylla-Wachs, Psyllostearylalkohol und Psyllostearylsäure. 3. Mittheilung . . . . .	355

## HEFT V.

(Ausgegeben am 4. Juni 1901.)

<b>Jolles, Adolf.</b> Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper . . . .	361
<b>Salkowski, E.</b> Ueber das Verhalten der Pentosen, insbesondere der l-Arabinose im Thierkörper . . . . .	393
<b>Kutscher, Fr.</b> Die Oxydationsprodukte des Arginins. II. Mittheilung . . . . .	413
— — Ueber das Hefetrypsin . . . . .	419
<b>Schulz, Fr. N., und Fr. Dittborn.</b> Notiz über den aus Cerebrin abspaltbaren Zucker . . . . .	425
— — Weiteres über Galactosamin . . . . .	428
<b>Hammarsten, Olof.</b> Untersuchungen über die Gallen einiger Polarthiere. I. Ueber die Galle des Eisbären. Erster Abschnitt.	435
<b>Habermann, J., und R. Ehrenfeld.</b> Ueber Proteinstoffe. Einwirkung des nascirenden Chlors auf Casein . . . . .	467
<b>Kutscher, Fr.</b> Die Ueberführung des rechtsdrehenden Arginins in die optisch inactive Modification . . . . .	476

## HEFT VI.

(Ausgegeben am 6. Juli 1901.)

<b>Bendix, E.</b> Ueber physiologische Zuckerbildung nach Eiweissdarreichung . . . . .	479
<b>Folln, O.</b> Eine neue Methode zur Bestimmung des Harnstoffs im Harn . . . . .	504
— — Ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des Ammoniaks im Harn . . . . .	515
<b>Mayer, Paul.</b> Ueber eine bisher unbekannte reducirende Substanz des Blutes . . . . .	518
<b>Hedin, S. G., und S. Rowland.</b> Untersuchungen über das Vorkommen von proteolytischen Enzymen im Thierkörper . .	531
<b>Levene, P. A.</b> Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren . .	541
<b>Folln, O., und A. Shaffer.</b> Ueber die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn . . . . .	552
<b>Sieber, N.</b> Ueber die Entgiftung der Toxine durch die Superoxyde, sowie thierische und pflanzliche Oxydasen . . . . .	573
<b>Salaskin, S.</b> Ueber die Bildung des Leucinimids bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Oxyhämoglobins resp. des Globins . . . . .	592

# Ueber das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in gekeimten Samen und über seine Wirkung.

Von  
**Wl. Butkewitsch.**

---

(Aus dem agricultur-chemischen Laboratorium des eidgenössischen Polytechnikums in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 14. December 1900.)

---

Die ersten Angaben über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in den Samen finden wir in den Arbeiten von v. Gorup-Besanez und H. Will<sup>1)</sup> 1874 und 1875. Dieses Enzym wurde von den genannten Forschern aus den ungekeimten Wicken-, Hanf- und Leinsamen und den gekeimten Samen der Gerste, und zwar aus dem sogenannten gelben Darrmalz, nach der Wittich'schen Methode isolirt. Die aus dem Glycerinextract durch ätherhaltigen Alkohol ausgefällte und durch wiederholte Auflösung und Fällung gereinigte Substanz besass die Fähigkeit, ähnlich dem thierischen Pepsin, in Gegenwart von 0,2%iger Salzsäure Blutfibrin und geronnenes Eiereiweiss unter Bildung von Pepton zu verflüssigen. Die nach der gleichen Methode ausgeführten Versuche mit ungekeimter Gerste und Luftmalz, sowie mit Lupinensamen, *Secale cornutum*, Piniensamen, *Zea-Mays*, Mandeln und Bohnenkeimlingen ergaben negative Resultate.

Bald nach der Veröffentlichung der Arbeit von v. Gorup-

---

1) v. Gorup-Besanez, Ueber das Vorkommen eines diastatischen und peptonbildenden Fermentes in den Wickensamen. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. VII (1874), S. 1478; derselbe: Weitere Beobachtungen über diastatische und peptonbildende Fermente im Pflanzenreich ibidem, Bd. VIII (1875), S. 1510. — Ueber einige Angaben von Will, vergl. Krauch, landw. Versuchsstat., Bd. XXIII (1879), S. 78.

gekennzeichnet Phascolassanen ein ähnliches Enzym. Glycerinextract aus diesen Cotyledonen verdaute in Gegenwart von HCl Blutfibrin bis zur Peptonbildung, ein Extract aus den Axenorganen derselben Keimlinge zeigte diese Eigenschaft nicht.

Krauch<sup>2)</sup> untersuchte genau nach der von v. Gorup-Besanez benützten Methode eine ganze Reihe von Pflanzenobjecten, unter anderen Wickensamen und Darmmalz, konnte aber in keinem einzigen Falle Spuren des proteolytischen Enzyms entdecken. Sich auf seine Untersuchungen stützend kommt er zu dem Schlusse, dass die Beobachtungen von v. Gorup-Besanez irrthümlich seien. Die von diesem beobachtete Volumenverminderung der Fibrinflocken muss, nach Krauch's Meinung, ausschliesslich dem Einfluss des Glycerins und die Biuretreaction den löslichen Eiweissstoffen, die sich in dem von v. Gorup-Besanez enthaltenen Enzym-Präparat befanden, zugeschrieben werden.

So stand es mit der Frage über das Vorkommen proteolytischer Enzyme in den Samen, als Green zur Lösung derselben schritt. Er benutzte eine Methode, die etwas verschieden von der von seinen Vorgängern angewandten war.

Als Object seiner ersten Untersuchung<sup>3)</sup> dienten ihm die Cotyledonen gekeimter Lupinensamen (*Lup. hirsutus*). Die zerriebenen Cotyledonen wurden direkt mit Glycerin ausgezogen, ohne vorher mit Alkohol behandelt zu sein, wie es v. Gorup-Besanez that. Der erhaltene Extract wurde sorgfältig mittelst Dialyse von allen durch Pergamentpapier diffusiblen Körpern befreit, bis das Dialysat keine Biuretreaction mehr zeigte und keine Krystalle beim Eindampfen ausschied.

---

1) Van der Harst, Moondblad voor Naturwetensch., 1876, 20. Sep.

2) Krauch, Beiträge zur Kenntniss der ungeformten Fermente in Pflanzenreich, landw. Versuchsstat., Bd. XXIII (1879), S. 78; derselbe Ueber peptonbildende Fermente in den Pflanzen, ibidem Bd. XXVII (1883) S. 383.

3) J. R. Green, On the Changes in the Proteids in the Seeds which accompany Germination, Philos. Transactions of the Royal Society of London (B), 1887, Vol. 178, p. 39.

Die Wirkung des so gereinigten Extracts auf Blutfibrin wurde im Dialysator mit 0,2%iger Salzsäure bei einer Temperatur von 37—40° geprüft; im äussern Gefäss des Dialysators befand sich Salzsäure derselben Concentration. Unter diesen Bedingungen beobachtete Green Auflösung von Blutfibrin, und nach einiger Zeit gelang es ihm, eine klare Biuretreaction im Dialysat zu erhalten, die auf die Anwesenheit von Peptonen schliessen liess.

Bei vorsichtigem Eindampfen des Dialysats schieden aus demselben sich Krystalle aus, unter denen sich, wie Green angibt, Leucin und Tyrosin vorfanden. In der inneren Flüssigkeit des Dialysators wurden Parapepton und Albumosen nachgewiesen. Bei den Kontrollversuchen mit vorher aufgekochtem Samenextract und ohne Extract mit 0,2%iger Salzsäure allein konnte Green keine Verdauung des Fibrins und keine Bildung von ins Dialysat übergehenden Produkten constatiren; in der inneren Flüssigkeit des Dialysators wurden bei dem Versuche mit Salzsäure allein nur Spuren von Albumosen nachgewiesen.

Bei der Wiederholung dieses Versuchs mit aus Lupinensamen isolirten Eiweissstoffen bekam Green dasselbe Resultat; auch hier wurde im Dialysat die Anwesenheit von Peptonen constatirt, und beim Eindampfen des Dialysats ebenfalls die Abscheidung krystallinischer Produkte beobachtet. Bei allen diesen Versuchen konnte die Biuretreaction im Dialysat nie erhalten werden, wenn im Dialysator Ferment fehlte.

Zur Beseitigung jeglichen Zweifels bezüglich des Ursprungs der krystallinischen Produkte wechselte Green in einer Reihe von Versuchen mit Eiweissstoffen aus Samen, nach bestimmten Zeitintervallen, die Aussenflüssigkeit des Dialysators und fand bei der Untersuchung jeder einzelnen Fraction des Dialysats in den letzten Fractionen eine grössere Quantität krystallinischer Produkte als in den ersten, was auf ihre Bildung bei der Verdauung schliessen lässt. In einzelnen Fällen beobachtete Green beim Eindampfen des Dialysats die Abscheidung von Krystallen, die, wie er sagt, dem Asparagin ähnlich waren; jedoch sind sie von ihm nicht näher untersucht worden.

thode die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms im Endosperm der gekeimten Samen von *Ricinus communis*.<sup>1)</sup> Auch in diesem Falle wurden nach Green's Angaben unter den Produkten der Einwirkung des aus den Endospermen erhaltenen Extracts auf Fibrin nicht allein Pepton, sondern auch krystallinische Körper (Tyrosin) gefunden.

Etwas später hat Neumeister<sup>2)</sup> über das Vorkommen proteolytischer Enzyme in den Samen und den Keimpflanzen Versuche angestellt, bei denen er die Absorbirbarkeit solcher Enzyme durch frisches Blutfibrin zur Abscheidung derselben aus den Extracten zu verwenden suchte. Frisch bereitetes Fibrin wurde eine Zeit lang im wässerigen Extracte des untersuchten Objectes liegen gelassen und darauf in eine 0,8%ige Oxalsäurelösung (0,2%ige HCl übt nach Neumeister's Beobachtungen, eine zerstörende Wirkung auf das Enzym der Samen) gebracht und sammt dieser Lösung in den Brütöfen gestellt. Auf diesem Wege wurde die Anwesenheit eines proteolytischen Enzyms, auf die Neumeister aus der Fibrin-auflösung und der Peptonbildung schloss, nur in einigen Keimlingen (Gerste, Mohn, Rüben, Mais und Weizen) constatirt, wobei der Gehalt dieses Enzyms in den späteren Entwicklungsstadien der Keimpflanzen bedeutend zunahm.

Bei andern, im gleichen Alter wie die vorhergenannten untersuchten Keimlingen und jungen Pflanzen (Lupinen, Wicken, Erbsen, Roggen und Hafer), ebenso wie bei allen untersuchten ungekeimten Samen, konnte Neumeister nach seiner Methode kein Enzym nachweisen.

Bei einigen Pflanzen der letzten Kategorie constatirte Neumeister bei der Keimung der Samen die Bildung von Peptonen oder eine Zunahme des Gehaltes derselben und

---

1) J. R. Green, On the Germination of the Seed of the Castor oil-Plant (*Ricinus communis*). Proceedings of the Royal Society of London. Vol. XLVIII (1890), S. 370.

2) R. Neumeister, Ueber das Vorkommen und die Bedeutung eines eiweisslösenden Enzyms in jugendlichen Pflanzen. Zeitschr. für Biologie. Bd. 30 (1894), S. 447.

spricht deshalb die Meinung aus, dass in diesen Fällen die Peptonisirung der Eiweissstoffe in der Pflanze durch die Wirkung des lebendigen Protoplasmas bedingt wird. Diese von Neumeister ausgesprochene Ansicht stützt sich auf die Annahme, dass die von ihm zum Nachweis des proteolytischen Enzyms angewandte Methode die Anwesenheit desselben in allen Fällen, in denen es vorkommt, nachweisen muss.

Die von Frankfurt<sup>1)</sup> ausgeführten Untersuchungen mit Weizenkeimen zeigten jedoch, dass in einigen Fällen, in welchen das peptonisirende Enzym nach dem Wittich'schen Verfahren isolirt werden konnte, es unmöglich war, dasselbe nach der von Neumeister angewandten Methode nachzuweisen; diese Untersuchungen konnten daher Zweifel daran erwecken, dass Neumeister's Methode allgemein brauchbar ist.<sup>2)</sup>

Auffallend ist auch die Thatsache, dass Neumeister kein proteolytisches Enzym in den Samen und Keimlingen der von ihm untersuchten Leguminosen nachgewiesen hat, während doch bekanntlich die Keimung dieser Samen von einem besonders energischen Eiweisszerfall begleitet wird. Ausserdem stehen seine negativen Resultate für die Lupinenkeimlinge im Widerspruch mit den Resultaten der Untersuchung Green's, dessen Versuche sehr sorgfältig ausgeführt sind.<sup>3)</sup>

---

1) S. Frankfurt, Landw. Versuchsstat. Bd. 47 (1896), S. 466.

2) Als Mangel der von Neumeister benutzten Methode kann man wohl auch den Umstand betrachten, dass er bei der Darstellung des Extracts aus den untersuchten Objecten letztere einer vorherigen Trocknung nicht unterwarf. Diese Operation spielt eine bedeutende Rolle beim Nachweis der Enzyme, wie es die Angaben anderer Autoren für andere Enzyme (Diastase, Invertin, Glycase), ebenso die von Frankfurt (l. c.) für die peptonisirenden Enzyme der Weizenkeime gezeigt haben. Dem Einfluss des Trocknens ist es wahrscheinlich zuzuschreiben, dass Gorup-Besanez ein peptonisirendes Enzym in Darrmalz fand, seine Anwesenheit im Luftmalz aber nicht nachweisen konnte.

3) In seiner oben citirten Arbeit unterwirft Neumeister Green's Versuche einer scharfen Kritik. «Die Experimente», sagt er, «auf welche Green seine Resultate stützt, scheinen mir nichts weniger als überzeugend». Wie es scheint, war aber Neumeister mit den Originalabhandlungen Green's nicht bekannt. In seiner Kritik der Versuche des letztern erwähnt er einige wichtige Details der Versuche Green's



Enzyms in Samen finden wir in der vor Kurzem erschienenen ausgedehnten Arbeit von Fermi und Buscaglioni.<sup>1)</sup> Diese Autoren benutzten die von Fermi zur Untersuchung des proteolytischen Enzyms in den Bakterien zuerst angewandte Methode und wiesen in einer Reihe von gekeimten und von ruhenden Samen das Vorkommen eines Enzyms nach, welches die Fähigkeit, Gelatine zu verflüssigen, besitzt. In einigen Fällen gaben die Versuche mit Samen, sogar mit gekeimten, negative Resultate. Aber die Autoren selber schreiben diesem Befund keine endgültig entscheidende Bedeutung zu, weil die Resultate der Versuche für eine und dieselbe Art in verschiedenen Fällen verschieden ausfielen. M. Soave<sup>2)</sup> hat Eiweisspaltung in gekeimten Samen nachgewiesen, deren Entwicklung durch Einwirkung von anästhetischen Mitteln (Chloroform, Aether) vollständig aufgehoben wurde, und spricht

---

nicht, die von diesem in seiner ersten Arbeit (1887) beschrieben wurden; auch citirt er gar nicht diese Arbeit Green's, sondern nur eine spätere, im Jahre 1890 veröffentlichte über die Umwandlungen der Reservestoffe in den keimenden Ricinussamen, in welcher der Autor Versuche mit proteolytischem Enzym gar nicht näher beschreibt, und nur sagt, dass dieselben ebenso angestellt waren wie die Versuche mit Lupinensamen, und dass sie dieselben Resultate ergaben. Neumeister hält die von Green angewandte Methode zur Prüfung auf das Vorhandensein eines Enzyms mit Hülfe des Dialysators nicht für überzeugend, da 0,2%ige HCl schon an und für sich die Umwandlung von gequollenem Fibrin unter Bildung von diffusibeln Produkten (Albumosen und auch Peptonen) hervorruft, erwähnt aber nicht, dass Green in allen Fällen Kontrollversuche angestellt hatte, in welchen die Bildung solcher Produkte nicht beobachtet wurde. Ebenso erwähnt Neumeister nicht die krystallinischen Produkte, die von Green im Dialysat in denjenigen Fällen nachgewiesen wurden, in denen Fibrin oder Eiweissstoffe aus Samen der Einwirkung des Glycerinextracts unterworfen wurden.

<sup>1)</sup> Cl. Fermi und Buscaglioni, Die proteolytischen Enzyme im Pflanzenreiche. Centralbl. f. Bact., Parasitenk. etc. Abth. II, Bd. 5, 1899, S. 24.

<sup>2)</sup> Marco Soave, Contributo allo studio della funzione fisiologica dei fermenti chimici o enzimi nella vita della piante. Ricerche chimico-fisiol. sulla germinazione dei semi sotto l'azione degli anestetica. Le stuzioni sperimentali agrarie italiane. Vol. XXXII, Fasc. VI, 1899, S. 553.

danach auch die Vermuthung aus, dass in den Keimpflanzen ein eiweisspaltendes Enzym vorkommt.

Ferner müssen wir einige in neuester Zeit erschienene Arbeiten über das proteolytische Enzym des Malzes erwähnen. Laszczynski<sup>1)</sup> untersuchte nach verschiedenen Methoden grüne Gerstenkeimlinge und getrocknetes Malz. Er gelangte dabei zu einander widersprechenden Resultaten, kommt aber schliesslich zu den Schlussfolgerungen, dass die gekeimte Gerste kein proteolytisches Enzym enthält und dass die verschiedene Löslichkeit der stickstoffhaltigen Substanzen des Malzes von den Extractionsbedingungen abhängig ist. Zu derselben Schlussfolgerung kommt auch Loé,<sup>2)</sup> der die Wirkung der aus grünen Gerstenkeimlingen und aus Malz gewonnenen Extracte auf die in der Gerste vorhandenen Eiweissstoffe untersuchte.

Ganz vor Kurzem, als meine Arbeit schon zu Ende geführt war, erschienen beinahe gleichzeitig zwei Arbeiten, in denen, im Gegensatz zu den Schlussfolgerungen der eben genannten Autoren, die früheren Angaben von v. Gorup-Besanez und von Neumeister über das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms in der gekeimten Gerste eine überzeugende Bestätigung finden. Ausserdem finden wir in diesen Arbeiten Angaben, wonach die Eiweisspaltung durch das Malzenzym sich über die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Peptone hinaus erstreckt.

Eine dieser Arbeiten ist von Fernbach und Hubert.<sup>3)</sup> Zur Untersuchung wurde Malzextract, das durch Filtration mittelst des Chamberland'schen Filters bacterienfrei gemacht war, angewendet. Dieses Extract verflüssigte Gelatine. Bei einer Temperatur zwischen 20—70° der Verdauung unterworfen, verlor es eine erhebliche Menge der durch Erwärmen

---

1) B. de Verbno Laszczynski, Ueber das Vorkommen eines peptonisirenden Enzyms (Peptose) im Malz etc. Zeitschr. f. das gesammte Brauwesen. XXII, 1899, HH. 6, 7, 10 und 11.

2) W. Loé, Enthält das Malz ein peptonisirendes Enzym? Der Bierbrauer. 1899, H. 6.

3) A. Fernbach et L. Hubert, Sur la diastase proteolytique du malt. Compt. rend. T. 130, No. 26, S. 1783.

eine Thatsache, aus der die Autoren schliessen, dass die spaltende Wirkung des Enzyms noch über die Bildung von Peptonen hinausging. Die bei verschiedenen Temperaturen angestellten Versuche zeigen dabei, dass die Erhöhung der Temperatur bis 60° die Eiweisspeptonisirung beschleunigt, aber die Bildung von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Körpern hemmt (die relative Menge der letzten war grösser bei niedrigeren Temperaturen). Auch wurde aus dem Malzextract durch Fällen mittelst Weingeist eine Substanz erhalten, welche die Fähigkeit, durch Erhitzen coagulierte Eiweissstoffe des Malzextracts und unlösliche Stickstoffverbindungen der Gerste zu lösen, besass.

Eine Beschreibung derselben Erscheinungen in Bezug auf das Malzextract finden wir in einer anderen Arbeit von Windisch und Schellhorn.<sup>1)</sup> Zur Beseitigung von Mikroorganismen wandten diese als antiseptische Mittel Chloroform und Thymol an. Was die Bedingungen der Wirkung des proteolytischen Malzenzyms anbetrifft, so fand die Verdauung von Eiweissstoffen in alkalischen, neutralen und sauren Lösungen statt, als das günstigste Medium erwiesen sich aber 0,2—0,4%ige Lösungen von organischen Säuren (Milchsäure, Essigsäure, Bernsteinsäure). Bezüglich des Einflusses der Temperatur stellten Windisch und Schellhorn ebenso wie Fernbach und Hubert fest, dass bei höheren Temperaturen die Eiweisspaltung schnell, aber nicht weitgehend ist, bei niedrigeren umgekehrt. Das durch Fällung mittelst Weingeist aus dem Glycerinextract isolirte Enzym wirkte auf ungelöstes Eiweiss und eiweissartige Stoffe thierischen Ursprungs, vermochte aber nicht die in ungelöstem Zustande vorhandenen Gersten, resp. Malzeiweissstoffe anzugreifen. Die letzte Beobachtung widerspricht den oben erwähnten Ergebnissen von Fernbach und Hubert. Ferner haben Windisch und Schellhorn mit Hülfe der Fermi'schen Methode (Verflüssigung

---

1) W. Windisch und B. Schellhorn, Ueber das eiweisspaltende Enzym der gekeimten Gerste. Wochenschr. f. Brauerei, 1900, H. 24—29.

der Gelatine) das Vorkommen eines proteolytischen Enzyms auch in einigen anderen gekeimten Samen nachgewiesen.

Wie schon oben erwähnt, zerspaltete das von Green angewendete Glycerinextract aus Lupinen- und Ricinussamen, ähnlich dem thierischen Trypsin, die Eiweissstoffe bis zur Bildung krystallinischer Produkte. Diese interessante und auf diesem Gebiete einzige Beobachtung<sup>1)</sup> scheint gar keine Aufmerksamkeit auf sich gezogen zu haben, und fast bei keinem der Autoren, welche die Frage des Eiweisszerfalls bei der Keimung der Samen behandelt haben, finden wir irgend welchen Hinweis darauf, woran vielleicht neben der unvollständigen Identificirung jener Produkte durch Green (vgl. S. 32 u. 35) Neumeister's abfällige Kritik der Versuche Green's die Schuld trägt.<sup>2)</sup>

Um einen Beitrag zur Lösung der Frage über das Vorkommen des proteolytischen Enzyms in den Samen und über seine Wirkung zu geben, habe ich, bevor ich die Isolirung desselben unternahm, Versuche mit der Substanz der Samen selbst, ähnlich den Versuchen von Salkowski<sup>3)</sup> über «Autodigestion» der thierischen Organe angestellt. Ich lasse hier zunächst die Beschreibung der in dieser Weise von mir angestellten Versuche folgen.

---

1) Allerdings hat v. Gorup-Besanez (Ber. d. deutsch. chem. Ges. VII. 1. c.) einen Versuch gemacht, solche Produkte bei der Verdauung von Fibrin durch ein proteolytisches Enzym aus Wickensamen nachzuweisen. Bei diesem Versuche ging er von der Voraussetzung aus, dass man in dem von ihm in den Wickenkeimlingen gefundenen Asparagin und Leucinprodukte einer enzymatischen Spaltung der Eiweisskörper zu sehen habe. Sein Versuch aber ergab negative Resultate, vielleicht aus dem Grunde, weil er nicht wie Green gekeimte, sondern ruhende Samen genommen hatte.

2) Vergl. die Abhandlung von E. Schulze «Ueber den Eiweissumsatz und die Bildungsweise des Asparagins und Glutamins in den Pflanzen», Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI (1898/99), S. 411, sowie auch W. Pfeffer's «Pflanzenphysiologie», I. Bd., II. Aufl., 1897, S. 464 und 511. Die beiden genannten Autoren stützen sich nur auf die oben citirte Abhandlung von R. Neumeister.

3) E. Salkowski, Ueber Autodigestion der Organe. Zeitschr. f. klin. Med., Bd. XVII, 1890. Suppl., S. 77.

Folgende Gedanken lagen diesen Versuchen zu Grunde: Wenn man die gekeimten Samen bei einer Temperatur von  $35-40^{\circ}$  C. trocknet, so wird das in denselben etwa vorhandene Enzym nicht verändert werden. Wenn man nun die getrockneten Substanzen fein zerreibt, das zuvor mit Aether behandelte Pulver mit Wasser übergiesst und hierauf unter Bedingungen, welche die Mitwirkung von Spaltpilzen ausschliessen, eine Zeit lang auf  $35-40^{\circ}$  C. erwärmt, so können durch das Enzym die in der gepulverten Substanz vorhandenen Eiweissstoffe gelöst und vielleicht auch gespalten werden. Eine solche Wirkung des Enzyms kann dagegen nicht eintreten, wenn man bei im Uebrigen ganz gleicher Anordnung des Versuches das mit Wasser übergossene Keimpflanzenpulver kurze Zeit auf  $100^{\circ}$  erhitzt.

Ich habe solche Versuche sowohl mit gekeimten, als auch mit ungekeimten Samen angestellt. In allen Fällen wurden die Substanzen in der gleichen Weise vorbereitet. Nach dem Trocknen bei  $35-40^{\circ}$  C. wurden die Samen im Mörser zerkleinert, mit Hülfe der Dreefs'schen Reibe in ein staubfeines Pulver verwandelt und darauf während zwei bis drei Tagen mit Aether extrahirt.

Nach Beendigung des Erhitzens im Thermostat wurde in der Regel der Inhalt eines jeden Kolbens nach Stutzer's Vorschrift mit Kupferoxydhydrat erhitzt, dann aufs Filter gebracht, der Filterinhalt mit Wasser gut ausgewaschen und sodann für die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl's Methode verwendet; die so erhaltene Stickstoffmenge wurde als »Proteinstickstoff« in Rechnung gestellt. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure angesäuert, sodann mit Phosphorwolframsäure versetzt, der dadurch erzeugte Niederschlag abfiltrirt, mit 50/oiger Schwefelsäure ausgewaschen und gleichfalls zur Stickstoffbestimmung verwendet. Durch Subtraction des Proteinstickstoffs und der im Phosphorwolframsäureniederschlag gefundenen Stickstoffmenge vom Gesamtstickstoff ergab sich die Stickstoffquantität, welche den durch Phosphorwolframsäure nicht

fällbaren Verbindungen (Amidosäuren u. s. w.) angehörte. In einigen Fällen analysirte ich nicht den Gehalt des Kolbens, sondern nur die vom ungelösten Rückstand abfiltrirte Flüssigkeit; in abgemessenen Antheilen dieser Flüssigkeit wurden der Gesamtstickstoff, der Proteinstickstoff und die im Phosphorwolframsäureniederschlag enthaltene Stickstoffmenge bestimmt.

Es ist zuzugeben, dass diese in ihrer Ausführung sehr einfachen analytischen Verfahren unvollkommen sind. Dass man durch Stutzer's Methode in manchen Fällen keine scharfe Trennung der Proteinstoffe von den nichtproteinartigen Verbindungen erreichen kann, ist von verschiedenen Autoren<sup>1)</sup> hervorgehoben worden. In dem Niederschlag, welchen Phosphorwolframsäure in den nach Stutzer's Verfahren von den Eiweissstoffen befreiten Flüssigkeiten hervorbringt, können neben Peptonen Hexonbasen und andere Stoffe basischer Natur enthalten sein; dieser Niederschlag kann also Stickstoffverbindungen einschliessen, welche verschiedenen Stoffgruppen angehören. Wenn aber auch jene Methoden nur unvollkommenen Aufschluss über die Vertheilung des Gesamtstickstoffs auf die verschiedenen Stoffgruppen gewähren, so habe ich doch mit ihrer Hülfe mit Sicherheit nachweisen können, dass in meinen Versuchen die Eiweissstoffe eine starke Zersetzung erlitten und dass dabei auch Produkte, die nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, entstanden; die Anwendung jener Methoden genügte also für den Zweck, den ich bei Ausführung meiner Analyse verfolgte.

Es erschien wünschenswerth, in den Versuchsflüssigkeiten auch noch das beim Kochen mit verdünnter Salzsäure<sup>2)</sup> entstehende Ammoniak<sup>3)</sup> zu bestimmen, weil sich daraus nach Sachsse's Verfahren der Asparagingehalt der Flüssigkeiten berechnen lässt, freilich nur unter der Voraussetzung, dass

---

<sup>1)</sup> Ich verweise auf die Abhandlungen E. Schulze's sowie auf die oben citirte Arbeit Laszczynski's.

<sup>2)</sup> Auf 100 ccm. Flüssigkeit setzte ich 5 ccm. concentrirte HCl zu.

<sup>3)</sup> Im Folgenden kurz als «leicht abspaltbares Ammoniak» bezeichnet.

unter Ammoniakbildung zersetzbare Substanz sich vorfand. Ich hielt es für zweckmässig, für diese Bestimmung das Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag zu verwenden, weil durch die Fällung mit diesem Reagens die peptonartigen Stoffe und das ursprünglich vorhandene Ammoniak entfernt sein mussten. (Die in diesem Filtrat noch vorhandene Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure beseitigte ich mit Baryt.) In einigen Fällen wurde jedoch jene Bestimmung in Flüssigkeiten ausgeführt, die nur durch Fällung mit Bleiessig gereinigt worden waren.

#### **A. Versuche mit zweitägigen Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius*.**

Ungefähr gleiche Mengen der nach der oben beschriebenen Methode präparirten Keimpflanzensubstanz wurden in Erlenmeyer'sche Kolben gebracht, in jeden derselben eine bestimmte Quantität Thymolwasser gegossen und ausserdem noch festes, fein zerriebenes Thymol hineingethan, so dass letzteres also stets im Ueberschuss vorhanden war. Alle Kolben, deren es 10 gab, wurden darauf im Thermostat auf 35—40° erwärmt, nachdem die Kolben I und II zuvor 10 Minuten lang im Wasserbade auf fast 100° erhitzt worden waren. Nach Verlauf von 4 Tagen wurden zwei andere Kolben, III und IV, einem eben solchen Erwärmen wie die vorigen unterworfen und wieder in den Thermostat gestellt. Nach 4 Tagen wurde mit weiteren 2 Kolben ebenso verfahren u. s. w. Nach Verlauf von 16 Tagen wurde der Versuch beendet. Der Inhalt der Kolben wurde nun den oben beschriebenen Bestimmungen unterworfen. Die gleichen Bestimmungen wurden auch in der ursprünglichen Substanz ausgeführt; ausserdem wurde in letzterer auch der Gesamtstickstoff bestimmt.

Ehe ich die bei diesen Bestimmungen erhaltenen Zahlen folgen lasse, sei noch erwähnt, dass bei Beendigung der Versuche die in den Kolben über dem Ungelösten stehenden Flüssigkeiten klar waren, sowie auch, dass die zu Beginn des Versuches nicht zum Kochen erhitzten Flüssigkeiten beim Erwärmen mit Kupferoxydhydrat nach Stutzer's Vorschrift stark blaue Färbung annahmen, während die zu Beginn des

Versuchs gekochten Flüssigkeiten sich bei gleicher Behandlung nur hellgrün färbten. Diese Erscheinung deutet schon darauf hin, dass in den nicht gekochten Flüssigkeiten Amid- oder andere Stickstoffverbindungen, welche Kupferoxydhydrat lösen, sich vorfinden.

Von den bei den Analysen erhaltenen Zahlen führe ich nur die Durchschnittswerthe an:<sup>1)</sup>

Tabelle a.

	Ursprüng- liche Substanz	I u. II zu Anfang des Versuches gekocht	III u. IV nach 4 Tagen gekocht	V u. VI nach 8 Tagen gekocht	VII u. VIII nach 12 Tagen gekocht	IX u. X nach 16 Tagen gekocht
Abgewogene Sub- stanz . . . . .	—	2,1062 g	2,1637 g	2,0830 g	2,0205 g	2,0037 g
Gesamt-N . . .	7,07 %	—	—	—	—	—
Protein-N . . .	6,35 %	6,26 %	5,28 %	4,99 %	4,82 %	4,85 %
N im Phosphor- wolframsäure- niederschlag . .	0,30 %	0,34 %	0,43 %	0,42 %	0,44 %	0,43 %
N im Filtrat vom Phosphor- wolframsäure- niederschlag . .	0,42 %	0,47 %	1,36 %	1,66 %	1,81 %	1,79 %
N des leicht ab- spaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode) . .	0,12 %	—	—	—	0,28 %	0,37 %

Flüss. durch  
Ph. W. S. gereinigt.

Wie aus den angeführten Zahlen zu ersehen ist, erlitten die Eiweissstoffe in den nicht auf 100° erhitzten Kolben eine Veränderung, unter Bildung von Produkten, die nur zum Theil durch Phosphorwolframsäure fällbar waren, während die in den Kolben I und II befindliche Substanz ihre Zusammen-

<sup>1)</sup> Die analytischen Belege theile ich weder hier noch bei den später folgenden Versuchen mit. In Betreff dieser Belege verweise ich auf eine ausführlichere Publication, die in russischer Sprache erfolgen wird.



den erstgenannten Kolben die Bildung von Produkten konstatiert, die Ammoniak beim Kochen mit verdünnter HCl nach Sachsse abspalten. Zur Kontrolle dieser Beobachtung wurde noch ein Versuch angestellt, bei welchem nur der leicht abspaltbare Stickstoff nach Sachsse und der Ammoniakstickstoff nach Bosshard<sup>1)</sup> bestimmt wurden.

Tabelle b.

	I zu Anfang des Versuchs gekocht	II nach 8 Tagen gekocht	III nach 16 Tagen gekocht
Abgewogene Substanz . . . . .	4,3242 g	4,3049 g	4,1625 g
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks ) (nach Sachsse's Methode) . . . )	0,17 %	0,26 %	0,31 %
Ammoniak-N im Phosphorwolframsäure- niederschlag (nach Bosshard) . .	0,009 %	0,009 %	0,019 %

Auch hier wurde die Bildung von Produkten constatirt, die beim Erhitzen mit verdünnter Salzsäure Ammoniak geben. Der Ammoniakgehalt in der untersuchten Substanz war in allen Fällen ein unbeträchtlicher.

Die in meinen Versuchen beobachtete Eiweisszersetzung, welche durch kurzes Erhitzen des Kolbeninhalts auf ca. 100° verhindert werden konnte, kann wohl für sich allein, auch ohne dass die Resultate anderer Versuche noch berücksichtigt werden, als eine Bestätigung für Green's Annahme, dass in den Lupinus-Keimpflanzen ein proteolytisches Enzym sich findet, betrachtet werden; denn es ist nicht ersichtlich, welches andere Agens in diesen Versuchen die Eiweissstoffe zum Zerfall gebracht haben könnte. Dass es sich hier um die Wirkung des lebenden Protoplasmas der Keimpflanzen handelte, ist schon deshalb nicht anzunehmen, weil das Keimpflanzenpulver einige Tage unter Aether gewesen war. Ebenso wenig kann an die Mitwirkung von Spaltpilzen bei der Eiweisszersetzung gedacht werden, da Thymol im Ueberschuss zugesetzt war.

<sup>1)</sup> E. Bosshard, Ueber Ammoniakbestimmung in Pflanzensäften und Pflanzenextracten. Zeitschr. f. analyt. Chemie, Bd. XXII (1883), S. 329.

Um aber die Nichtbetheiligung von Spaltpilzen an dem beschriebenen Process noch bestimmter beweisen zu können, habe ich noch folgenden Versuch angestellt. In einen sterilisirten Kolben wurden ca. 2 g des Keimpflanzenpulvers gebracht, dann wurde Aether daraufgegossen und der Kolben nun mit einem Baumwollepfropfen verschlossen. Nach 3 Tagen liess ich den Aether bei einer Temperatur von 35—40° verdunsten und brachte dann eine durch Erhitzen sterilisirte Thymollösung unter den nöthigen Vorsichtsmassregeln in den Kolben. Dann wurde der Kolben in einem Versuche 3 Tage, in einem zweiten 7 Tage lang auf 35—40° erhitzt. Zwei andere Kolben, von denen einer bei Beginn des Versuchs auf ca. 100° erhitzt wurde, wurden mit ihrem Inhalt ebenso behandelt, wie es im Versuche a geschehen ist. Die bei der Analyse des Kolbeninhalts erhaltenen Resultate theile ich im Folgenden mit.

	I. Zu Anfang des Versuches gekocht	II. Nicht gekocht, sterilisiert	III. Nicht gekocht, sterilisiert	IV. Nicht gekocht, nicht sterilisiert
Dauer des Versuchs . . . .	7 Tage	3 Tage	7 Tage	7 Tage
Abgewogene Substanz . . .	2,028 g	2,057 g	2,014 g	2,025 g
Protein-N . . . . .	6,29 %	5,27 %	4,99 %	4,94 %

Man sieht aus den Zahlen der Tabelle, dass in den Kolben II und III, in denen eine Mitwirkung von Spaltpilzen absolut ausgeschlossen war, trotzdem Spaltung von Eiweissstoffen stattgefunden hatte und dass diese Spaltung im Kolben III ebenso stark gewesen war, wie in dem ebenso lange im Thermostaten erhitzten Kolben IV, welcher nur in der gewöhnlichen Weise behandelt wurde.

Ich kehre nun noch einmal zu einer Betrachtung der Tabelle a zurück. Die Zahlen dieser Tabelle zeigen, dass der Eiweisszerfall in den ersten Tagen ziemlich energisch vor sich ging, dann langsamer wurde und nach 12 Tagen vollständig aufhörte. Die Menge der in diesem Zeitraum zerfallenen Proteinstoffe beträgt ca. 24% der ursprünglichen Menge derselben.

In der Annahme, dass die genannte Verzögerung und

Produkte bedingt wird, haben ich mit derselben Substanz einen anderen Versuch mit einer verhältnissmässig grösseren Menge Wasser angestellt. In diesem Falle wurde die Flüssigkeit nach Beendigung des Versuchs zuerst durch Flanell und dann durch ein Papierfilter filtrirt. Das Volumen des Filtrats wurde gemessen und in bestimmten Quantitäten desselben der Gesamt-N, der Protein-N u. s. w. bestimmt. Alle in den Tabellen angeführten Zahlen drücken den Stickstoffgehalt in Procenten der für den Versuch verwendeten Substanz aus.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle c.

	I. Zu Anfang des Versuches gekocht	II. Nicht gekocht
Abgewogene Substanz . . . . .	10,5063 g	10,9340 g
N im ungelösten Rückstand . . . . .	4,96 ‰	3,40 ‰
Protein-N im Filtrat . . . . .	1,24 ‰	1,50 ‰
Protein-N (zusammen) . . . . .	6,20 ‰	4,90 ‰
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0,31 ‰	0,45 ‰
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäure- niederschlag . . . . .	0,56 ‰	1,72 ‰
N des leicht abspaltbaren Ammo- (Bl.) <sup>1)</sup>	0,16 ‰	0,37 ‰
niaks (nach Sachsse's Methode) (Ph.-W.) <sup>2)</sup>	0,12 ‰	0,27 ‰

Bei diesem Versuche ging der Eiweisszerfall nicht weiter, als bei dem vorhergehenden. Der nächste Versuch zeigte, dass im Filtrat vom II. Kolben kein actives Enzym vorhanden war. Aus diesem Filtrat wurden 50 ccm. (das gesammte Filtrat betrug 266 ccm.) genommen und wieder 7 Tage lang in den Thermostat gestellt. Die Analyse zeigte keine Veränderungen.

Protein-N 1,49‰; N im Phosphorwolframsäureniederschlag 0,47‰; N nach Sachsse (Flüss. durch Ph.-W.S. gereinigt) 0,27‰.

Man darf wohl annehmen, dass in den Keimpflanzen die

1) Die Flüssigkeit wurde mittelst Bleiessig gereinigt.

2) Die Flüssigkeit wurde durch Phosphorwolframsäure gereinigt.

Bedingungen für die Wirkung des Enzyms noch günstiger liegen, als es in meinen Versuchen der Fall war. Denn erstens werden in den Keimpflanzen die durch das Enzym entstandenen Produkte aus den Cotyledonen, in denen das Enzym sich neben den seiner Wirkung unterliegenden Reserveproteinstoffen vorfindet, beständig weggeführt; zweitens ist das Enzym in concentrirterer Lösung vorhanden und es ist bekannt, dass eine grosse Wassermenge schädlich auf die Enzyme wirkt. Endlich aber darf man auch annehmen, dass in den Keimpflanzen das Enzym immer wieder von Neuem sich bildet, wofür sowohl Angaben von Neumeister, von Green und von Windisch und Schellhorn, als auch die mit anderen Enzymen gemachten Erfahrungen sprechen.<sup>1)</sup>

Ferner stellte ich im Hinblick auf die Angabe Green's, dass das proteolytische Enzym bei Gegenwart 0,2%iger Salzsäure am besten wirkte, einen Versuch mit der gleichen Substanz (von zweitägigen Lupinenkeimlingen) und unter denselben Versuchsbedingungen an, wobei ich jedoch statt Thymolwasser Salzsäure obiger Concentration zusetzte. Parallel damit wurde auch ein Versuch mit 0,1%iger Sodalösung angestellt. In beiden Fällen wurde, wie auch früher, festes Thymol im Ueberschusse zugesetzt.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle d.

	I. 0,2 % HCl	II. 0,1 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
Abgewogene Substanz . . . . .	10,558 g	5,290 g
N im ungelösten Rückstand . . . . .	3,92 %	2,35 %
Protein-N im Filtrat . . . . .	1,86 %	3,19 %
Protein-N (zusammen) . . . . .	5,78 %	5,54 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0,65 %	0,39 %
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäure- niederschlag . . . . .	0,64 %	1,14 %

In der nächstfolgenden Tabelle werden die Resultate dieser Versuche mit denen der früheren Versuche zusammengestellt.

1) Vergl. die Arbeit Pfeffer's. Ueber die regulatorische Bildung der Diastase. Sitzungsber. d. Sächs. Ges. d. Wissenschaft, 1896, S. 513.

Abnahme	Protein-N . . . . .	1,53	1,45	0,57	0,81
Zunahme	N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	0,14	0,15	0,35	0,09
	N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	1,39	1,30	0,22	0,72

Natriumcarbonat verzögerte also den Eiweisszerfallsprocess, veränderte aber nicht das Mengenverhältniss, in welchem die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffverbindungen zu den durch dieses Reagens nicht fällbaren stickstoffhaltigen Stoffen stehen. Salzsäure verzögerte diesen Process noch mehr, änderte aber auch das Verhältniss der Produkte zu einander. Die Hauptmenge der letzteren fand sich im Phosphorwolframsäureniederschlag vor, was darauf hindeutet, dass in diesem Falle hauptsächlich Albumosen und Peptone gebildet wurden.<sup>1)</sup>

#### B. Versuche mit ungekeimten Samen von *Lupinus angustifolius*.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle e.

	Ursprüngl. Substanz	I 0,2% HCl zu Anfang des Ver- suches gekocht	II 0,2% HCl	III Wasser nicht gekocht
Abgewogene Substanz . . . . .	—	2,113 g	2,267 g	2,060 g
Protein-N . . . . .	6,23%	6,28%	5,64%	5,66%
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	0,28%	0,28%	0,59%	0,39%
Abnahme des Protein-N . . . . .	—	—	0,59%	0,57%

<sup>1)</sup> Diese Angaben, die auf die prävalirende Bildung von Peptonen in Gegenwart von 0,2%iger HCl hindeuten, finden eine Bestätigung auch bei einem andern, später von mir angestellten Versuche mit der Substanz von Cotyledonen der 6tägigen Keimlinge von *Lupinus luteus*. Der Versuch wurde in 3 Dialysatoren ausgeführt. In zweien derselben befand sich die Substanz der Cotyledonen, mit Thymolwasser, wobei der Inhalt des einen vorher gekocht wurde. Im III. Dialysator war dieselbe Menge

		Ursprüngl. Substanz	0,2 % HCl zu Anfang des Ver- suches gekocht	II 0,2 % HCl	in Wasser nicht gekocht
Zunahme	N im Phosphorwolfram- säureniederschlag . . .	—	—	0,31 %	0,11 %
	N im Filtrat vom Phosphor- wolframsäurenieder- schlag . . . . .	—	—	0,28 %	0,46 %

Nach Green befindet sich in den ungekeimten Lupinen-  
samen Zymogen, das durch die Einwirkung von verdünnter  
HCl in das active Enzym umgewandelt wird. Aus diesem  
Grunde verwendete ich bei diesem Versuche HCl. Wie aber  
aus meinen Zahlen zu ersehen ist, beschleunigte dieselbe,  
ebenso wie im vorigen Versuch, den Zerfall der Eiweissstoffe  
nicht und verzögerte insbesondere die Bildung von Produkten,  
die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar sind.

Meine Beobachtungen über den Einfluss von HCl stimmen  
mit der Angabe von Neumeister überein, nach welcher « das  
in den Pflanzen enthaltene Enzym mit 0,2%iger HCl nur  
Anfangs zu wirken schien, dann aber durch dieselbe allmählich  
zerstört wurde.» <sup>1)</sup>

Daraus geht aber hervor, dass alle Versuche von Green  
(der 0,2%ige HCl anwandte) mit dem proteolytischen Enzym  
der Samen in einem für seine Wirkung ungünstigen Medium  
ausgeführt wurden. Wahrscheinlich erklärt sich daraus der  
Umstand, dass in den Versuchen von Green, wie er selbst  
angibt, das von ihm untersuchte proteolytische Enzym sehr  
langsam auf die Eiweissstoffe einwirkte und dass dabei  
Zwischenprodukte (Parapepton und Albumosen) in grosser  
Menge sich bildeten.<sup>2)</sup>

Substanz enthalten, wobei das Wasser durch 0,2%ige HCl ersetzt war.  
Nach 3 tägigem Stehen im Thermostaten wurde das Dialysat mittelst der  
Biuretreaction geprüft. Die Dialysate I und II gaben keine irgendwie  
bemerkbare Reaction, in dem III. dagegen war dieselbe eine vollständig  
deutliche.

<sup>1)</sup> Neumeister l. c.

<sup>2)</sup> Green. Philos. Transact. l. c.

sei, so sind zum Vergleich nur Versuche mit 1, 1,5 und 5%igen Sodalösungen und 0,2, 0,4, 1%igen HCl-Lösungen von ihm ausgeführt worden.<sup>1)</sup> Weder ein neutrales Medium noch ein solches mit geringerem Säuregehalt als 0,2%iger HCl wurden von ihm untersucht. Bezüglich des neutralen Mediums finden wir Angaben bei Neumeister, welcher «das zur Absorption benutzte Fibrin in ein wenig kochsalzhaltiges Wasser brachte» und dabei die Auflösung des Fibrins nicht constatiren konnte.<sup>2)</sup> Nach Green's Beobachtungen aber wird die Wirkung des Enzyms durch die Gegenwart von geringen Mengen von NaCl in der Flüssigkeit auch dann verhindert, wenn dieselbe mit HCl angesäuert wird (0,2%).

Aus dem Gesagten ersieht man, dass die Frage nach dem günstigsten Medium für die Wirkung des proteolytischen Enzyms noch nicht als vollständig gelöst betrachtet werden kann. Jedenfalls haben meine Versuche gezeigt, dass der schwache Säuregehalt der Versuchsflüssigkeit, der durch die Beschaffenheit der von mir verwendeten Keimpflanzensubstanz bedingt war, günstiger als 0,2%ige Salzsäure wirkt. Nach den Angaben von Neumeister tritt die Wirkung des Enzyms bei Gegenwart von 0,2%iger Salzsäure weniger hervor als bei Gegenwart von 0,4—0,8%iger Oxalsäure. Aus dieser Beobachtung, sowie aus den oben erwähnten Ergebnissen, zu denen Windisch und Schellhorn in ihrer Arbeit gelangten, darf man wohl schliessen, dass das proteolytische Enzym bei Gegenwart geringerer Menge von organischen Säuren am besten wirkt.

#### C. Versuche mit 4tägigen Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius*.

Diese Versuche sowie auch die zunächst folgenden wurden ebenso ausgeführt, wie es oben für die zuerst beschriebenen Versuche angegeben worden ist.

Dauer der Versuche 12 Tage. Temperatur 35—40°.

---

1) Green, l. c.

2) Neumeister l. c.

Tabelle f.

	Ursprüngl. Substanz		Abnahme(—) resp. Zunahme(+)
Abgewogene Substanz . . . . .	—	20,271 g	—
Gesamt N . . . . .	7,38%	—	—
N im ungelösten Rückstand . . . . .	—	3,02%	—
Protein-N im Filtrat . . . . .	—	1,70%	—
Protein-N (zusammen) . . . . .	6,38%	4,72%	— 1,60
N im Phosphorwolframsäurenieder- schlag . . . . .	0,32%	0,38%	+ 0,06
N im Filtrat vom Phosphorwolfram- säureniederschlag . . . . .	0,73%	2,28%	+ 1,55
N des leicht abspaltbaren Am- moniaks (nach Sachsse's	{ Bl. . 0,30% Ph.-W. 0,20%	0,63%	+ 0,33
Methode)		0,47%	+ 0,27

In diesem Versuche wurden ca. 25% der ursprünglich vorhandenen Eiweissstoffe, d. h. fast ebenso viel wie im entsprechenden Versuche mit 2tägigen Keimpflanzen gespalten.

**D. Versuche mit 5tägigen Keimpflanzen von Ricinus major.**

Dauer des Versuchs 12 Tage, Temperatur 35—40°.

Tabelle g.

	Ursprüngl. Substanz		Abnahme(—) resp. Zunahme(+)	
Abgewogene Substanz . . . . .	—	8,118 g	—	
Gesamt-N . . . . .	10,12%	—	—	
N im ungelösten Rückstand . . . . .	—	5,77%	—	
Protein-N im Filtrat . . . . .	—	1,79%	—	
Protein-N (zusammen) . . . . .	8,24%	7,56%	— 0,68	
N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,25%	0,48%	+ 0,23	
N im Filtrat von Phosphorwolframsäure- niederschlag . . . . .	1,63%	2,08%	+ 0,45	
N des leicht abspaltbaren Am- moniak (nach Sachsse's Me- thode)	{ (Bl.).	0,55%	0,66%	+ 0,11



Bei diesem Versuche wurden nur die Cotyledonen und nicht die ganzen Keimpflanzen wie bei den vorigen Versuchen angewendet:

Dauer des Versuchs: I. 6 Tage; II. 12 Tage.

Temperatur 35—40°.

Tabelle h.

	Ursprüngl. Substanz	I	Diff.	II	Diff.
Abgewogene Substanz . .	—	6,7485 g	—	22,0525 g	—
Gesammt-N . . . . .	5,28%	—	—	—	—
N im ungelösten Rückstand	—	2,10%	—	1,68%	—
Protein-N im Filtrat . . .	—	2,04%	—	2,07%	—
Protein-N (zusammen) . .	4,61%	4,14%	— 0,47	3,75%	— 0,86
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . . .	0,06%	0,09%	+ 0,03	0,21%	— 0,15
N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag . . .	0,61%	1,05%	+ 0,44	1,32%	+ 0,71
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (Bl.) .	0,19%	0,26%	+ 0,07	0,32%	+ 0,13
(nach Sachsse's Methode) (Ph. W.)	0,17%	0,22%	+ 0,05	0,31%	+ 0,14
Ammoniak-N (nach Boss-hard) . . . . .	—	—	—	0,009%	—

Bei der Vergleichung der Zahlen der I. und II. Reihe, die eine Abnahme des Protein-N ausdrücken, kann es scheinen, dass der Eiweisszerfall in den letzten 6 Tagen mit derselben Intensität wie in den ersten vor sich ging. In Wirklichkeit aber kann dieser Schluss aus unsern Resultaten nicht gezogen werden, da die Bedingungen der Versuche I und II nicht dieselben waren; bei II wurde verhältnissmässig mehr Substanz und weniger Wasser als bei I genommen. Es muss angenommen werden, dass auch hier wie beim Versuche mit *Lupinus angustifolius* der Process allmählich an Geschwindigkeit abnahm, dass die Bedingungen aber für die Wirkung des Enzyms bei Versuch II günstiger als bei I waren.

**F. Versuche mit 6tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*.**

In diesem Falle wurden sowohl die Cotyledonen als auch die Axenorgane untersucht.

Gesamt-N in den Cotyledonen 11,12%; in den Axenorganen 7,74%. Dauer des Versuchs mit Cotyledonen: I. 6 Tage, II. 12 Tage; mit Axenorganen: 8 Tage. Temperatur 35—40°.

Tabelle i.

	Ur- sprügl. Subst.	Cotyledonen				Axenorgane	
		im Thermostat				im Thermostat	
		12 Tage	6 Tage	12 Tage		8 Tage	
		Zu Anfang d. Vers. gekocht	nicht gekocht		Zu Anfang d. Vers. gekocht	nicht gekocht	
Abgewogene Substanz . . .	—	7,00 g	7,00 g	7,00 g	5,00 g	5,00 g	
N im ungelösten Rückstand .	—	4,51 %	3,08 %	2,80 %	1,74 %	1,30 %	
Protein-N im Filtrat . . . .	—	2,15 %	2,16 %	2,35 %	0,74 %	0,66 %	
Protein-N (zusammen) . . .	6,77 %	6,66 %	5,24 %	5,15 %	2,48 %	1,96 %	
N im Phosphorwolframsäure- niederschlag . . . . .	0,93 %	0,96 %	1,16 %	1,17 %	0,15 %	0,11 %	
N im Filtrat vom Phosphor- wolframsäureniederschlag .	3,42 %	3,50 %	4,72 %	4,80 %	5,11 %	5,67 %	
N des leicht abspaltbaren { Ammoniaks (nach { Bl. .	1,06 %	1,09 %	—	1,39 %	2,33 %	2,47 %	
Sachsse's Methode)							
Abnahme des Protein-Ns . .	—	—	1,53 %	1,62 %	—	0,52 %	
{ N im Phosphorwolfram- säureniederschlag . .	—	—	0,23 %	0,24 %	—	—0,04 %	
{ N im Filtrat vom Phosphor- wolframsäureniederschlag	—	—	1,30 %	1,38 %	—	0,56 %	
Zunahme { N des leicht abspalt- baren Ammoniaks { Bl. .	—	—	—	0,33 %	—	0,14 %	
(nach Sachsse's Methode)							

Bei diesem Versuche wurde die Zerspaltung der Eiweissstoffe sowohl bei den Cotyledonen als bei den Axenorganen constatirt. In beiden Fällen, wie auch in allen vorigen, wurde die Bildung von Substanzen beobachtet, welche beim Kochen mit verdünnter HCl nach Sachsse's Methode Ammoniak abspalten.

an, welchen Einfluss andere antiseptische Mittel auf die Wirkung des proteolytischen Enzyms der Samen haben. Als solche Mittel wurden Chloroform und Blausäure angewendet. Das erstere ist neben Thymol das gewöhnlich bei solchen Versuchen mit Enzymen angewendete Antisepticum. Was die Blausäure anbetrifft, so ist durch die Versuche von Schönbein und in neuester Zeit von Schär<sup>1)</sup> festgestellt, dass sie die katalytische Wirkung der Enzyme schon in 0,1—0,2%iger Lösung stark schwächt. Von dieser Beobachtung geleitet, hat Schär die Meinung ausgesprochen, dass die letztere als diagnostisches Mittel für Enzyme Anwendung finden kann. Indem die Blausäure aber die katalytische Wirkung der Enzyme schwächt oder gänzlich hemmt, bleibt sie bekanntlich ohne bedeutenden Einfluss auf ihre spezifische Wirkung.<sup>2)</sup>

Ich will hier nur einige Beobachtungen anführen, die sich auf proteolytische Enzyme beziehen. Loew<sup>3)</sup> hat gezeigt, dass Pancreastrypsin gegenüber Blausäure mehr als andere Enzyme widerstandsfähig ist. So fand er, dass eine 25%ige Blausäure in 5 Stunden das diastatische, aber nicht das proteolytische Enzym des Pancreas zerstört. Nach Vines<sup>4)</sup> verdaut das proteolytische Enzym von *Nepentes* Fibrin in Gegenwart 1%iger Blausäure. Den Beobachtungen von Geret und Hahn<sup>5)</sup>

---

1) Festschrift Zürich, Alb. Müller, 1891.

2) Dass die von Schönbein entdeckte Eigenschaft der Enzyme, das Wasserstoffsuperoxyd zu zerspalten, in keiner unmittelbaren Verbindung mit ihrer spezifischen Wirkung steht, ist schon von Jakobson (Untersuchungen über lösliche Fermente. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XVI, S. 340) festgestellt. Zu demselben Schlusse kommt auch O. Loew in seiner vor Kurzem erschienenen Arbeit: «A new enzyme of general occurrence, with special reference to the Tobacco plant.» U. S. Departement of Agriculture. Bullet. No. 3, Washington 1900.

3) Oscar Loew, Die chemische Energie der lebenden Zellen. München 1899, S. 149.

4) Vines, The proteolytic Enzyme of *Nepentes*. Annales of Botany 11, 1897, S. 563.

5) L. Geret und Hahn, Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. Ber. der deutschen chemischen Gesellschaft 31, 1898, S. 2335.

zu Folge wird die Wirkung des im Hefepresssaft enthaltenen proteolytischen Enzyms in Gegenwart von 1%iger Blausäure etwas geschwächt, aber nicht gänzlich aufgehoben. Nach der Entfernung der Blausäure aus der Lösung mittelst Durchleiten von Luft war die Wirkung des Enzyms auf Eiweissstoffe dieselbe wie ohne Blausäure; die letztere zerstört folglich das Enzym nicht, sie hindert nur temporär seine Wirkung, was nach der Meinung der Autoren auf die Säurewirkung zurückzuführen ist.

In der weiter unten folgenden Tabelle führe ich die Resultate an, welche in den vergleichenden Versuchen der Wirkung des Enzyms bei Gegenwart von Blausäure, Thymol und Chloroform erhalten wurden, wobei die beiden letzteren im Ueberschusse (ein Theil des Chloroforms blieb während des Versuches auf dem Boden des Kolbens ungelöst) und die Blausäure in zwei Concentrationen: 0,1% und 1,0% angewendet wurden. Alle Kolben wurden gut verschlossen und 5 Tage im Thermostaten stehen gelassen.

Tabelle k.

	Ursprüngliche Substanz	Thymol nicht gekocht	Chloroform nicht gekocht	Blausäure		
				0,1% nicht gekocht	1,0% nicht gekocht	1,0% gekocht
Abgewogene Substanz . . . . .	—	2,051 g	2,1593 g	2,178 g	2,1105 g	2,147 g
Vol. der Flüssigkeit	—	20 ccm.	20 ccm.	20 ccm.	20 ccm.	20 ccm.
Gesammt-N . . .	9,85 %	—	—	—	—	—
Protein-N . . . .	6,85 %	5,74 %	5,80 %	4,34 %	3,73 %	6,80 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	0,50 %	0,84 %	0,80 %	1,29 %	2,31 %	—
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode) (Ph.-W.)	0,65 %	0,84 %	0,80 %	—	1,02 %	0,71 %

die Abnahme der Proteinstoffmenge bei Gegenwart von Chloroform und von Thymol fast die gleiche ist. Sie beträgt ca. 16% der ganzen Proteinmenge. Mit Blausäure ging die Eiweisspaltung viel weiter (bei Gegenwart von 0,1%iger Blausäure 36,6%, von 1%iger 45,5%). Die Zahlen der letzten Columnne der Tabelle beweisen, dass eine 1%ige Blausäurelösung an und für sich in den Fällen, wo das Enzym durch Kochen zerstört wurde, keine Eiweisspaltung hervorruft.

Nachdem ich solche Resultate mit der Blausäure erhielt, wiederholte ich den Versuch unter denselben Bedingungen, wobei ich jedoch die Versuchsdauer bis auf 10 Tage verlängerte. Nach dem Verlaufe dieser Zeit ergab die Analyse folgende Resultate:

	Blausäure	
	0,1%	1,0%
Abgewogene Substanz . . . . .	2,093 g	2,035 g
Vol. der Flüssigkeit . . . . .	20 ccm.	20 ccm.
Protein-N . . . . .	4,00 %	3,57 %
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . .	1,58 %	2,61 %
N des leicht abspaltbaren Ammoniaks (nach Sachsse's Methode) (Ph.-W.) . . . .	1,11 %	1,09 %

In diesem Versuche erstreckte sich der Zerfall der Eiweissstoffe nicht viel weiter wie im vorherigen, der nur 5 Tage dauerte. (Bei Gegenwart von 0,1%iger Blausäure verminderte sich der Proteinstickstoffgehalt auf 37,9%, von 1%iger auf 48%.) Somit wurde hier dieselbe Erscheinung wie in den vorangegangenen Versuchen beobachtet: die Reaction verlief energisch nur im Anfang des Versuches.

Es seien hier Ergebnisse, die die Umwandlung von Proteinstoffen bei den soeben beschriebenen Versuchen charakterisiren, angeführt:

	Dauer des Versuchs					
	5 Tage				10 Tage	
	Thymol	Chloroform	Blausäure			
0,1 %			1,0 %	0,1 %	1,0 %	
Abnahme des Protein-N . . . . .	1,11 %	1,05 %	2,51 %	3,12 %	2,85 %	3,28 %
Zunahme des N im Phosphorwolframsäureniederschlag	0,34 %	0,30 %	0,79 %	1,81 %	1,08 %	2,11 %
Zunahme des N im Filtrat vom Phosphorwolframsäureniederschlag	0,77 %	0,75 %	1,72 %	1,31 %	1,77 %	1,17 %

Wenden wir unsere Aufmerksamkeit auf das Mengenverhältniss der in diesem Versuche entstandenen Produkte, so bemerken wir, dass Blausäure und im Besonderen 1%ige eine bedeutende Erhöhung der relativen Menge der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte hervorruft. Dieselbe Erscheinung wurde für 0,2%ige Salzsäure beobachtet. Wir haben es augenscheinlich hier mit der Wirkung eines sauren Mediums zu thun. Vielleicht ist die Steigerung der Energie des Eiweisszerfalls auch auf die Wirkung der Blausäure als Säure zurückzuführen. Diese Annahme über den günstigen Einfluss schwacher organischer Säuren auf die Wirkung proteolytischer Enzyme der Keimpflanzen findet Bestätigung in den Angaben anderer Autoren.

Es wurde schon früher bei den Versuchen mit den Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius* darauf hingewiesen, dass der Phosphorwolframsäureniederschlag nur geringe Mengen von Ammoniak enthält. Es taucht nun die Frage auf, ob sich letzteres bei der Verdauung von Eiweissstoffen bei Gegenwart von Blausäure in beträchtlicher Menge bildet, und ob sich nicht daraus der grössere Stickstoffgehalt des Phosphorwolframsäureniederschlags erklärt. Zur Lösung dieser Frage wurde von mir unter denselben Bedingungen wie früher ein Versuch

mit Blausäure angestellt, nach dessen Beendigung das im Phosphorwolframsäureniederschlag vorhandene Ammoniak durch Destillation mit Magnesia bestimmt wurde. Der Versuch dauerte 10 Tage.

0,1% Blausäure 1,0% Blausäure  
Ammoniak-N im Phosphorwolframsäureniederschlag 0,14% 0,23%.

Der Phosphorwolframsäureniederschlag enthielt somit bei den Versuchen mit Blausäure thatsächlich in ziemlich beträchtlicher Menge Ammoniak. Ziehen wir den Ammoniakstickstoff ab, so bleibt die relative Menge des für diesen Niederschlag noch verbleibenden Stickstoffs dennoch grösser, als bei den Versuchen mit Chloroform und Thymol. Für die letzteren beträgt dieser Werth ca. 30%; für 1%ige Blausäure mehr als 57% des Stickstoffs der zerspaltenen Eiweissstoffe; für 0,1%ige Blausäure ist jedoch der Unterschied beinahe verschwindend klein.

Aus diesen Beobachtungen scheint hervorzugehen, dass eine 1%ige Blausäure die durch das Enzym hervorgerufene Peptonisirung der Eiweissstoffe beschleunigt, aber ihre weitere Umwandlung in durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Produkte hemmt.

## **II. Versuche mit einem aus den Keimpflanzen dargestellten Enzympräparat.**

Zur Abscheidung des Enzyms aus den Keimpflanzen bot sich als einfachster Weg das Wittich'sche Verfahren (Extraction mit Glycerin und Fällung mit Alkohol) dar. Vor Anwendung desselben suchte ich aber über die Wirkung des Alkohols auf das Enzym Aufschluss zu gewinnen; denn manche Enzyme, z. B. die Glycase,<sup>1)</sup> sind empfindlich gegen Alkohol.

Ich stellte daher einen Versuch mit der Substanz von zweitägigen Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius* an. Diese

---

1) Vergl. über thierische Glycase Rohmann, Zur Kenntniss der Glycase, Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XXVII (1894), S. 3251; über Glycase der Hefe Rohmann, l. c. und E. Fischer, Einf. d. Configur. etc. Ber. d. d. chem. Gesellsch., Bd. XVII (1894), S. 3479; über Glycase der Samen Angelo Pugliese, Arch. f. Physiol., Bd. LXIX (1897), S. 115.

Substanz wurde einer fünfstündigen Einwirkung von absolutem Alkohol ausgesetzt. Dann wurde sie ebenso behandelt, wie in den früher beschriebenen Versuchen geschah.

Nach siebentägiger Verdauung im Thermostaten wurden gefunden:

	Gekocht	Nicht gekocht
Proteinstickstoff . . . . .	6,53 %	5,38 %
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	0,38 %	0,72 %

In der nicht gekochten Probe verminderte sich der Gehalt an Proteinstickstoff um 17%. Ein unter denselben Bedingungen angestellter Versuch mit derselben Substanz, aber ohne vorhergegangene Behandlung mit Alkohol, ergab folgende Resultate:

	Ursprüngl. Substanz	7 Tage im Thermostaten
Proteinstickstoff . . . . .	6,33 %	4,99 %

In diesem Versuche verminderte sich die Menge der Eiweissstoffe um 21,2%. Das Enzym wurde somit durch fünfstündige Behandlung mit absolutem Alkohol nur ganz unbedeutend in seiner Wirkung geschwächt.

Ich konnte nun zur Abscheidung des Enzyms schreiten.

Als Material für die Darstellung des Enzyms verwendete ich bei 35—40° getrocknete und gepulverte Cotyledonen sechstägiger Keimpflanzen von *Lupinus luteus*.

300,0 g dieses Materials wurden mit 800 ccm. wässerigen Glycerins (500 ccm. Glycerins + 300 ccm. Wasser) durchgemischt und die Mischung 2 Tage stehen gelassen. Das Extract wurde darauf mit der Presse durch Filtrirtuch abgepresst und hierauf durch Papier filtrirt. Das vollständig klare, dunkelgefärbte Filtrat wurde unter stetigem Umrühren in ein grosses Volumen (3 Liter) Weingeist von 95% gegossen. Es bildete sich dabei ein leicht zu Boden sinkender flockiger



gegossen, der Niederschlag auf einer Nutsche abgesogen, zuerst mit 95%igem, hierauf mit absolutem Alkohol und Aether gewaschen und im Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet. Die getrocknete Substanz wurde im Mörser zum feinen Pulver zerrieben und in diesem Zustande für die weiteren Versuche verwendet.

Ein beträchtlicher Theil des so gewonnenen Präparates war in Wasser unlöslich. Die Lösung wie auch der ungelöste Rückstand gaben stark die Eiweissreactionen. Da also das Präparat reich an Eiweissstoffen war, so konnten die ersten Versuche zur Lösung der Frage über die Anwesenheit eines Enzyms in demselben und über die vom letzteren hervorgerufene Eiweissumwandlung mit diesem Präparat selbst angestellt werden.

Es wurden zwei gleiche Proben desselben im Gewicht von 2,5 g genommen; zu jeder wurden 50 ccm. Thymolwasser und 0,1%ige Blausäure hinzugesetzt. Eine Probe wurde dann aufgeköcht und beide in den Thermostaten gebracht. Nach Verlauf von 5 Tagen, wobei der bei der Extraction mit Wasser in der Kälte ungelöst gebliebene Rückstand beinahe ganz in Lösung gegangen war, wurden in beiden Proben Bestimmungen des Stickstoffs der beim Kochen coagulirenden Eiweissstoffe ausgeführt, in der von ihnen befreiten Flüssigkeit Stickstoff im Kupferhydroxydniederschlag und endlich im Filtrate des letzteren Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag bestimmt.

	Gekocht	Nicht gekocht
Stickstoff in den durch Kochen coagulirbaren Eiweissstoffen .	130,52 mg	76,07 mg
Stickstoff im Kupferhydroxydniederschlag . . . . .	75,50 „	53,76 „
Summe . . .	206,02 mg	129,83 mg — 76,19
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	32,45 „	41,75 „ + 18,30

In den beiden ersten Rubriken finden wir für die nicht gekochte Flüssigkeit eine erhebliche Abnahme des Stickstoffs, die 37% desselben in der gekochten Flüssigkeit beträgt. Für den Phosphorwolframsäureniederschlag finden wir dagegen eine Stickstoffzunahme, die jedoch die oben angezeigte Abnahme nicht zu decken vermag und nur ca. 25% desselben betrug. Somit haben die Eiweissstoffe auch hier wie beim früheren Versuch mit der Substanz der Keimlinge eine Umwandlung erlitten, unter Bildung von Produkten, welche nur zum Theil durch Phosphorwolframsäure fällbar waren.

Bei einem anderen Versuche verwendete ich ein nach Ritthausen's Methode aus den Lupinensamen dargestelltes Conglutinpräparat und die vom ungelösten Theil abfiltrirte, wässrige Lösung des Enzympräparates. In 2 Kolben wurden je 10 ccm. dieser Lösung hineingethan; eine Probe wurde aufgekocht und zu beiden je 0,1%ige Blausäure zugesetzt. Nach dem Eintragen von 0,4 g Conglutin in jedes derselben wurden beide in den Thermostat gestellt, darin 7 Tage stehen gelassen, hierauf eine Stickstoffbestimmung in den durch Kochen coagulirbaren Eiweissstoffen und im Filtrate von denselben eine gleiche Bestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag ausgeführt.

	Gekocht	Nicht gekocht
Stickstoff der beim Kochen coagulirbaren Eiweissstoffe . . .	66,07 mg	44,76 mg — 21,31
Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	20,59 „	35,67 „ + 15,08

Bei diesem Versuche wandelte sich ca. 32% des Conglutins in durch Kochen nicht coagulirbare Substanzen um. Ein Theil derselben, wie aus der Zusammenstellung der Abnahme des Eiweissstickstoffs und der Zunahme des Stickstoffs im Phosphorwolframsäureniederschlag ersichtlich ist, ist in Produkte übergeführt, die nicht durch Phosphorwolframsäure fällbar sind.

durch das proteolytische Enzym bildeten sich Produkte, die durch Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden. Die Spaltung geht folglich über die Bildung von echten Peptonen hinaus. Daraus kann nicht ohne Weiteres geschlossen werden, dass sich hier, wie es bei der tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe der Fall ist, Amidosäuren bildeten. Die Untersuchungen der neuesten Zeit (Lawrow,<sup>1)</sup> Zunz<sup>2)</sup> haben gezeigt, dass bei der energischen Verdauung thierischer Eiweissstoffe durch Pepsin sich eine beträchtliche Menge von Körpern bildet, die keine Biuretreaction zeigen, von Phosphorwolframsäure nicht gefällt werden und nach Pfaundler<sup>3)</sup> eine Zwischenstufe echter Peptone und Amidosäuren bilden. Somit ist die Anwesenheit von durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkten noch kein Beweis für die Anwesenheit von Amidosäuren.

Es wurde schon oben erwähnt, dass nach den Angaben von Green die Bildung von Leucin und Tyrosin aus Fibrin unter dem Einflusse des Extractes aus Lupinenkeimpflanzen stattfindet. Die Quantität, in welcher Green diese Körper erhielt, war jedoch so gering, dass seine Versuche nicht als ganz überzeugend betrachtet werden können. Bei dem Leucin stützte sich Green vorzugsweise auf die mikroskopische Untersuchung. Die gewonnenen Krystalle wurden, wie er angibt, unter dem Mikroskop mit der Abbildung des Leucins, die in Funke's «Physiological Atlas» sich findet, verglichen. Ausserdem stellte er nur noch die für Leucin wenig charakteristische Scherer'sche Reaction an. Zum Nachweis des Tyrosins bedient er sich allein der Probe mit Millon'schem Reagens, wobei er selbst bemerkt, dass der von ihm beobachteten

---

1) D. Lawrow, Zur Kenntniss des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweissstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. XXVI (1899), S. 513.

2) E. Zunz, Ueber den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweisspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVIII (1899), S. 132.

3) M. Pfaundler, Zur Kenntniss der Endprodukte der Pepsinverdauung. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIX (1900), S. 90.

Rothfärbung keine entscheidende Bedeutung zukommen kann, weil in der Versuchsflüssigkeit ein wenig Pepton vorhanden sein konnte. Was die krystallinischen Produkte, welche der Autor bei der Verdauung der Eiweissstoffe aus den Lupinensamen erhalten hat, anbetrifft, so wurden dieselben von ihm nicht untersucht; wenigstens finden wir in seiner Arbeit eine solche Untersuchung nicht erwähnt.

Zur Entscheidung der Frage über die Bildung von Amidosäuren bei der Verdauung von Eiweissstoffen durch das Enzym der Samen wurden von mir einige Versuche, deren Beschreibung ich hier folgen lasse, angestellt.

### Versuche mit Conglutin.

Für einen dieser Versuche wurden genommen 6 g Conglutin<sup>1)</sup> mit 5,42 g Trockensubstanz, eine beträchtliche Quantität der aus dem Glycerinextract in früher beschriebener Weise durch Alkohol gefällten enzymhaltigen Substanz und 150 ccm. Thymolwasser; ausserdem wurden fein zerriebenes Thymol und Chloroform im Ueberschusse zugesetzt. Diese Mischung wurde in dem Thermostaten in einem lose verstopferten Kolben 3 Wochen lang auf 35—40° erwärmt. Im Verlaufe dieser Zeit hatte sich die Menge des Conglutins bedeutend vermindert; eine vollständige Auflösung erfolgte aber nicht.<sup>2)</sup> Eine Gewichtsbestimmung des ungelösten Conglutins (nach Abrechnung des besonders bestimmten unlöslichen Rückstandes des Enzym-Präparates) zeigte, dass mehr als die Hälfte, nämlich 2,76 g, des angewandten Conglutins in Lösung gegangen waren.

Die vom ungelösten Rückstand abfiltrirte Flüssigkeit wurde unter Zusatz einiger Tropfen Essigsäure bis zum Kochen erhitzt. Die dabei entstandene Ausscheidung wurde abfiltrirt, das Filtrat durch Eindampfen im Wasserbade stark concentrirt

---

1) Ueber die Herkunft und Darstellung dieses Conglutinpräparates habe ich schon oben Angaben gemacht.

2) Das verwendete Conglutin war nach der Ausfällung aus alkalischer Lösung mit Alkohol und Aether behandelt und über Schwefelsäure getrocknet worden. Es ist vielleicht nicht unmöglich, dass es durch diese Behandlungsweise schwieriger angreifbar durch Enzyme geworden war.

erfolgte, die sich beim längeren Stehen als syropose Masse am Boden und an den Wandungen des Gefässes ansammelte; die davon abgegossene klare, weingeistige Lösung wurde im Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Es entstand bald an der Oberfläche des Syrups eine dem unreinen Leucin gleichende Ausscheidung, welche mittelst eines Zeugfilters von der Mutterlauge getrennt, mit etwas Weingeist gewaschen und dann noch auf eine Thonplatte gebracht wurde. Das so gewonnene Produkt bildete eine gelbliche, zerreibliche, dem unreinen Leucin gleichende Masse, im Gewicht von 0,15 g. Aus der Mutterlauge liess sich nach der auch von Gorup-Besanez benutzten Methode noch eine kleine Menge der gleichen Substanz gewinnen: Die Mutterlauge wurde mit Bleiessig versetzt, der dabei entstandene Niederschlag abfiltrirt und zum Filtrat Ammoniak und noch etwas Bleiessig hinzugefügt. Die so erhaltene Fällung wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelblei auf dem Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Im Ganzen wurden von diesem, dem rohen Leucin gleichenden Produkt fast 0,2 g gewonnen.

Dieses Produkt wurde mit heissem Weingeist unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit behandelt. Der grösste Theil dieses Produktes löste sich auf bis auf einen kleinen Rückstand, der sich als Tyrosin erwies: er löste sich nämlich schwer in Wasser, leicht in Ammoniakflüssigkeit und gab die Hoffmann'sche und die Piria'sche Reaction.

Aus der weingeistigammoniakalischen Lösung des Produktes schied sich beim Stehen über Schwefelsäure eine weisse Substanz aus, welche noch mehrfach aus ammoniakalischem Weingeist umkrystallisirt wurde. Sie bildete nun kleine, glänzende Blättchen, verhielt sich beim Erhitzen im Röhrchen wie Leucin (weisses Sublimat und Geruch nach Amylamin) und löste sich nicht in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung.<sup>1)</sup> Endlich gab die heisse wässerige Lösung dieser Substanz auf Zusatz von Kupferacetat eine dem Leucinkupfer gleichende

1) Zur Darstellung dieser Leucinlösung diente ein durch Erhitzen von Conglutin mit Salzsäure dargestelltes Leucinpräparat.

Ausscheidung. Somit konnte kein Zweifel mehr darüber obwalten, dass hier Leucin vorlag.

Das verwendete Enzympräparat enthielt, wie seine Untersuchung zeigte, weder Leucin noch Tyrosin; bei Behandlung desselben mit heissem Alkohol unter Zusatz von Ammoniakflüssigkeit entstand ein Extract, in welchem keine Spur von den genannten Amidosäuren aufgefunden werden konnte. Tyrosin und Leucin bildeten sich folglich bei der Wirkung des von mir aus den Lupinenkeimlingen dargestellten Enzyms auf das Conglutin.

Es entsteht nun die Frage, ob durch die Thätigkeit des Enzyms neben Leucin und Tyrosin auch Asparagin, das in den Keimpflanzen der Lupinen in so ausserordentlich grosser Menge auftritt, sich gebildet hatte. Dabei ist zunächst zu erwähnen, dass Green<sup>1)</sup> diese Frage bejahen zu können glaubt. Seiner Behauptung liegt aber mehr eine aprioristische Auffassung als ein experimenteller Nachweis zu Grunde. In seiner Arbeit finden wir eine Angabe, wonach beim Eindampfen des Dialysats von der in Verdauung begriffenen Mischung des Glycerinextracts mit der aus Lupinensamen dargestellten Eiweisssubstanz sich in einigen Fällen Krystalle ausschieden, die äusserlich dem Asparagin sehr ähnlich waren; über die Natur derselben macht der Autor keine weiteren Angaben. Man kann daher vermuthen, dass die Menge der Krystalle sehr gering war, denn sonst ist es unbegreiflich, warum es ihm nicht möglich war, ihre Natur durch die für Asparagin so charakteristischen Reactionen festzustellen. Green's Angabe über die Bildung von Asparagin durch das Enzym ist also so unbestimmt, dass auf sie kein Gewicht zu legen ist.

Unter den Produkten, die bei dem oben beschriebenen Versuche über die Einwirkung des Enzyms auf Conglutin erhalten wurden, liessen sich Asparaginkrystalle nicht auffinden. Da aber die in diesem Versuch erhaltene Lösung, nach der Concentration im Wasserbade, mit viel Alkohol vermischt worden ist, so wäre es möglich, dass etwa vorhandenes As-

---

<sup>1)</sup> Green, Philos. Trans. l. c.

der Flüssigkeit entfernt wurde. Ich habe nicht versucht, aus der durch Alkohol gefällten Substanz Asparagin durch Krystallisation zu gewinnen, weil mein Enzympräparat nach der Art seiner Darstellung eine geringe Menge von Asparagin enthalten konnte und auch wirklich zu enthalten schien.

Zur Entscheidung der obigen Frage musste also Enzym angewendet werden, welchem kein Asparagin beigemischt war. Um solches zu erhalten, behandelte ich das Enzympräparat mit kaltem Wasser und unterwarf die Lösung unter Zusatz von Chloroform 4 Tage lang unter häufiger Erneuerung der äusseren Flüssigkeit der Dialyse durch Pergamentpapier. Während das erste Dialysat beim Verdunsten asparaginähnliche Krystalle lieferte, konnten solche aus den später erhaltenen Dialysaten nicht mehr gewonnen werden; man kann also annehmen, dass das Asparagin vollständig entfernt war, was ja auch im Hinblick auf die Leichtigkeit, mit welcher das genannte Amid durch Pergamentpapier diffundiert, a priori zu erwarten war.

Mit der in dieser Weise gereinigten Enzymlösung behandelte ich nun wieder das Conglutin. Ich brachte in drei Kölbchen je 50 ccm. der chloroformhaltigen Enzymlösung, und nachdem Kölbchen I kurze Zeit im Wasserbade bis fast auf den Siedepunkt erhitzt worden war, fügte ich in jedes Kölbchen je 3,5 g Conglutin = 3,16 g wasserfrei hinzu. In das Kölbchen III brachte ich noch mehr Chloroform, in die Kölbchen I und II so viel Blausäure, dass der Gehalt an letzterer 0,5% betrug. Alle drei Kölbchen wurden darauf 7 Tage lang im Thermostat auf 35—40° erwärmt. Dann wurde der Inhalt eines jeden Kölbchens zum Kochen erhitzt und aufs Filter gebracht, der Filterinhalt mit Wasser, Alkohol und Aether ausgewaschen, bei 100° getrocknet und gewogen.

Ich erhielt folgende Zahlen:

aus Kölbchen I . . . . .	3,75 g Rückstand
"      "      II . . . . .	2,30 "      "
"      "      III . . . . .	2,70 "      "

Also waren im Kölbchen II 1,45 g, im Kölbchen III 1,05 g

in Lösung gegangen. Aus dem zu Beginn des Versuches auf nahezu 100° erhitzten Kölbchen I, in welchem das Enzym nicht wirken konnte, erhielt ich 3,75 g Rückstand, also etwas mehr als das angewendete Conglutin betragen hatte. Dies erklärt sich daraus, dass aus der Enzymlösung beim Kochen eine Ausscheidung von Eiweisssubstanz entstand.

Die vom Rückstand abfiltrirten Flüssigkeiten wurden durch Versetzen mit Tannin und Bleiessig gereinigt, nach der Filtration durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Blei befreit, sodann mit Ammoniak neutralisirt und im Wasserbade bei gelinder Wärme zum Syrup eingedunstet.

Nach wochenlangem Stehen war in keiner der concentrirten Flüssigkeiten eine Ausscheidung von Asparaginkrystallen zu bemerken; an der Oberfläche der Flüssigkeiten II und III schied sich aber eine Substanz, die dem unreinen Leucin gleich war, aus. Die Ausscheidung der Flüssigkeit III wurde direkt auf eine Tonplatte gebracht, von der Mutterlauge befreit und in heissem ammoniakhaltigen Alkohol gelöst. Die aus der alkoholischen Lösung zur Ausscheidung gebrachte Substanz gab, wie Leucin, beim Erhitzen im Röhrchen ein weisses Sublimat, unter gleichzeitigem Auftreten eines Amylaminengeruches. Beim Erwärmen der Substanz mit Millon'schem Reagens trat eine schwache Rothfärbung auf, was auf eine Beimengung von Tyrosin deutet.

Die zum Syrup eingedunsteten Flüssigkeiten I und II wurden im Exsiccator über concentrirter Schwefelsäure stehen gelassen und darauf gewogen.

I. Gekocht:

0,815 g

II. Nicht gekocht:

1,510 g.

Syrup II (mit Blausäure) wurde darauf mit etwas Wasser verdünnt und mit einem beträchtlichen Volumen Alkohol versetzt; die klare Flüssigkeit wurde von dem abgesetzten Niederschlage abgegossen und nochmals zum Syrup eingedampft. Aus diesem schied sich eine dem Leucin ähnliche Substanz aus, die gleichfalls auf einer Tonplatte von der Mutterlauge befreit und in heissem, ammoniakhaltigem Alkohol gelöst wurde. Beim Stehen über concentrirter Schwefelsäure schied sich aus



der Lösung eine weisse, dem Leucin ähnliche Substanz aus; beim Erhitzen im Röhrchen gab dieselbe ein weisses Sublimat und zeigte einen Geruch nach Amylamin. Auch hier machte die Rothfärbung mit Millon'schem Reagens eine Beimengung von Tyrosin wahrscheinlich.

Die gekochte Probe lieferte bei gleicher Behandlung keine leucinartige Ausscheidung.

Dieselbe durch Dialyse gereinigte Lösung des Enzyms wurde auch für einen Versuch mit Fibrin verwendet. Flocken desselben in die Lösung eingetragen (mit oder ohne Blausäure) lösten sich sehr energisch auf; die Flocken wurden zuerst flüssig, die Flüssigkeit trübte sich darauf und wurde nach längerem Stehen im Thermostaten wieder klar.

Nach zweitägiger Verdauung von einigen Fibrinflocken mit 30 ccm. der Enzymlösung in Gegenwart von Chloroform bei 35° wurde die Flüssigkeit vom ungelösten Fibrinrückstand abfiltrirt und auf dem Wasserbade zum Syrup eingedunstet. Aus dem letzten ist es gelungen, eine kleine Menge einer dem Leucin ähnlichen Substanz zu gewinnen. Dieselbe war schwer im Wasser, leicht in Ammoniakflüssigkeit löslich und gab beim Erhitzen im Röhrchen ein weisses Sublimat.

Dieser Versuch war mit einer so kleinen Menge Fibrin angestellt, dass über die dabei entstandenen Produkte vollständiger Aufschluss nicht zu gewinnen war; ich behalte mir daher vor, diesen Versuch unter Anwendung grösserer Substanzmenge zu wiederholen.

Ich habe somit nachgewiesen, dass bei der Einwirkung des aus den Keimpflanzen abgeschiedenen Enzyms auf Eiweissstoffe Leucin und Tyrosin entstehen; dass neben diesen Produkten auch Asparagin sich bildet, konnte ich dagegen nicht nachweisen.

### **III. Versuche über die Qualität der bei der Autolyse oder Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz sich bildenden Produkte.**

Aus den oben mitgetheilten Resultaten meiner Analysen lassen sich bestimmte Schlussfolgerungen auf die Qualität der bei der Autolyse (Selbstverdauung) der Keimpflanzensubstanz

entstehenden Produkte noch nicht machen. Ist auch nachgewiesen worden, dass unter diesen Produkten durch Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoffverbindungen sich vorfanden, so lassen doch die im Abschnitt II erwähnten Beobachtungen einiger Autoren noch Zweifel daran übrig, ob dies Amidosäuren waren, obwohl andererseits die von mir in den Versuchen mit Conglutin nachgewiesene Bildung von Leucin und Tyrosin das Entstehen dieser beiden Amidosäuren auch bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz sehr wahrscheinlich macht.

Sodann ist aus der Thatsache, dass bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz eine Stickstoffverbindung entstand, welche beim Kochen mit verdünnter Salzsäure Ammoniak abspaltete, noch nicht zu schliessen, dass bei jenem Prozesse Asparagin sich bildet; denn jene Stickstoffverbindung kann ja eine vom Asparagin verschiedene Substanz sein, welche gegen verdünnte Salzsäure das gleiche Verhalten zeigt, wie Asparagin.

Um Aufschluss über die Qualität der bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz entstehenden Produkte zu erhalten, habe ich eine Reihe von Versuchen angestellt. Von denselben beschreibe ich zunächst zwei Versuche mit je 50 g der in früher beschriebener Weise präparierten Substanz von viertägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* stammend. Ich brachte die abgewogenen Substanzmengen unter Zusatz von Thymolwasser in zwei Kolben, von denen in einen jeden, nachdem der eine (A) im Wasserbade bis fast auf den Siedepunkt erhitzt worden war, so viel Blausäure zugesetzt wurde, dass der Inhalt der letzteren 0,2% betrug; beide Kolben wurden sodann 6 Tage lang im Thermostaten auf 35—40° erwärmt. Sodann wurde der Inhalt eines jeden Kolbens aufs Filter gebracht und die abfiltrirten Flüssigkeiten vollkommen gleich behandelt.

Jedes von den Filtraten wurde vorsichtig so lange mit Bleiessig versetzt, als sich noch ein Niederschlag bildete; die Niederschläge wurden abfiltrirt, die Filtrate mittelst Schwefelwasserstoff vom Blei befreit, darauf mit Ammoniak neutralisirt

Flüssigkeit der nicht gekochten Probe bildete sich schon beim Eindampfen an der Oberfläche eine Ausscheidung, die sich nach zweitägigem Stehen an einem kühlen Orte zu einer dicken Haut, gleich derjenigen, die gewöhnlich Leucin bildet, gestaltete. Die ausgeschiedene Masse wurde von der Mutterlauge mittelst eines Zeugfilters getrennt, mit Weingeist gewaschen und über Schwefelsäure getrocknet. Es wurde auf diese Weise 0,5 g Rohprodukt erhalten. Die Mutterlauge sammt den Waschflüssigkeiten wurde wieder zum Syrup eingedampft und in den Exsiccator gestellt. Dorthin wurde auch der Syrup von der nicht gekochten Probe, in der beim längeren Stehen nach dem Eindampfen keine Ausscheidung zu bemerken war, gebracht. Nach längerem Stehen über concentrirter Schwefelsäure wurden beide Syrupe gewogen:

gekocht ca. 15 g, nicht gekocht ca. 25 g.

Hieraus ist ersichtlich, dass die Fraction, in der das Enzym durch Kochen nicht zerstört wurde, durch Bleiessig nicht fällbare Substanzen in viel grösserer Menge enthielt als die gekochte Fraction.

Nach dem Wägen wurden beide Syrupe mit Wasser verdünnt und mit viel Weingeist versetzt, wobei eine starke Ausscheidung entstand. Die von letzterer abgegossenen weingeistigen Lösungen wurden wieder zum Syrup eingedunstet. Auch diesmal gab der Syrup von der gekochten Probe nach längerem Stehen keine Ausscheidung. Der andere (von der gekochten Fraction) lieferte dagegen bald wieder eine dem rohen Leucin gleichende Ausscheidung, die wieder mit Hülfe eines Zeugfilters von der Mutterlauge getrennt und dann zur Entfernung der ihr von derselben anhaftenden Reste auf eine Thonplatte gestrichen wurde. Die von dieser Abscheidung abfiltrirte Mutterlauge lieferte, als sie wieder in der gleichen Weise behandelt wurde, noch einmal ein leucinartiges Produkt. In dieser Weise wurde ungefähr 1,1 g dieses Produktes erhalten. Dasselbe wurde zerrieben und mit heissem Weingeist unter Zusatz von etwas Ammoniakflüssigkeit behandelt; der grösste Theil ging dabei in Lösung.

Der ungelöste Rückstand wurde mit wässerigem Ammoniak behandelt, wobei er grösstentheils sich löste. Die Lösung lieferte, beim Verdunsten über Schwefelsäure, eine weisse, in kaltem Wasser sehr schwer lösliche Substanz, welche sich als Tyrosin erwies. Sie gab sowohl die Hoffmann'sche wie die Piria'sche Reaction.

Aus der von jenem Rückstand abfiltrirten alkoholischen Lösung schied sich beim Stehen über Schwefelsäure eine weisse, dem unreinen Leucin gleichende Substanz aus. Dieselbe wurde mehrmals aus ammoniakhaltigem Alkohol umkrystallisirt, wodurch sie sich in glänzende weisse dem Leucin gleichende Krystallblättchen verwandelte. Dieses gereinigte Präparat löste sich ziemlich schwer in kaltem Wasser, zeigte beim Erhitzen im Röhrchen das Verhalten des Leucins (weisses Sublimat und Geruch nach Amylamin) und löste sich nicht in einer gesättigten wässerigen Leucinlösung. Aus der heissen Lösung schied sich beim Zusatz von Kupferacetat die für Leucin charakteristische Kupferverbindung ab. Die Substanz gab auch die Scherer'sche Reaction.

Es wurden auf diese Weise aus der im Anfang des Versuches nicht gekochten Flüssigkeit Leucin und Tyrosin erhalten, die offenbar Produkte der Wirkung des Enzyms sind, weil aus der gekochten Flüssigkeit sie mit Hülfe derselben Operationen nicht abgeschieden werden konnten.<sup>1)</sup>

---

<sup>1)</sup> Das bei der gekochten Flüssigkeit erhaltene Resultat steht nur scheinbar in Gegensatz zu E. Schulze's (Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. XXIV, 1898, S. 106 und Bd. XXX, 1900, S. 281) Angaben über das Vorkommen von Leucin und Tyrosin in 6—8tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus*. Denn auch E. Schulze vermochte aus wässerigen Extracten aus solchen Keimpflanzen jene Amidosäuren nicht durch Krystallisation zur Abscheidung zu bringen. Dagegen erhielt er sie bei Verarbeitung weingeistiger Extracte aus den Cotyledonen unter Bedingungen, die offenbar für die Abscheidung jener Amidosäuren viel günstiger sind. Uebrigens ist E. Schulze bei Gewinnung dieser Stoffe stets auch von etwas älteren Keimpflanzen und von grösseren Quantitäten des Untersuchungsmaterials ausgegangen und er hat trotzdem zwar Leucin aus drei Keimpflanzenculturen von *Lupinus luteus*, Tyrosin dagegen nur aus einer solchen Cultur abzuscheiden vermocht.

auch Asparagin sich gebildet hatte. Um dies zu entscheiden, mussten, da die ursprüngliche Keimpflanzensubstanz schon Asparagin in beträchtlicher Menge enthielt, quantitative Bestimmungen ausgeführt werden. Ich konnte mich aber nicht allein auf die nach Sachsse's Methode ausgeführten Bestimmungen stützen; denn es ist ja möglich, dass das beim Kochen der Flüssigkeiten mit verdünnter Salzsäure entstandene Ammoniak nicht ausschliesslich aus Asparagin abgespalten worden war. Es war also auch festzustellen, wie gross die Asparaginmenge war, die sich aus den Versuchsflüssigkeiten in Substanz abscheiden liess.

Man kann bekanntlich leicht Asparagin in Krystallen gewinnen, indem man die Extracte aus *Lupinus*-Keimpflanzen auf ein geringes Volumen eindunstet. Dies ist auch in diesem Falle versucht worden; doch blieben nach dem Auskrystallisiren des Asparagins so dickflüssige Mutterlaugen übrig, dass die Krystalle von denselben nur schwierig und jedenfalls nicht ohne Verlust getrennt werden konnten.<sup>1)</sup> Ich schlug daher einen anderen Weg ein. Die filtrirten Versuchsflüssigkeiten wurden mit Tannin und Bleizucker versetzt, die so erhaltenen Niederschläge abfiltrirt und ausgewaschen, die Filtrate mit Mercurinitratlösung in schwachem Ueberschuss vermischt, die so erzeugten Niederschläge nach dem Abfiltriren und Auswaschen, in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zersetzt. Die vom Schwefelquecksilber abfiltrirten Lösungen neutralisirte ich mit Ammoniak und dunstete sie sodann im Wasserbade bei gelinder Wärme zum Syrup ein, wobei ich durch Zutropfen von Ammoniumcarbonat die Reaction der Flüssigkeit möglichst neutral erhielt. Aus den concentrirten Flüssigkeiten krystallisirte bald Asparagin aus; die Krystalle wurden nach mehrtägigem Stehen von der Mutterlauge getrennt, über Schwefelsäure getrocknet und gewogen. Da man wegen der sauren Reaction der Mercurinitratlösung annehmen

---

<sup>1)</sup> Ungleich leichter lässt sich das Asparagin aus den Extracten aus älteren *Lupinus*-Keimpflanzen durch Krystallisation gewinnen.

musste, dass die Ausfällung des Asparagins keine vollständige war, so habe ich den Filtraten von den Mercurinitratniederschlägen Sodalösung zugesetzt, bis die Reaction nur noch schwach sauer war; die dabei entstandenen weissen Niederschläge lieferten, als sie in oben beschriebener Weise behandelt wurden, gleichfalls Asparaginkristalle; letztere wurden mit den zuerst erhaltenen vereinigt.

### Versuch I.

Im Folgenden theile ich nun zunächst die Resultate mit, die ich bei Versuchen mit 4tägigen Keimpflanzen von *Lupinus luteus* erhielt. Ich brachte je 20 g des in früher beschriebener Weise präparirten Keimpflanzenpulvers in 3 Kölbchen, setzte in zwei Kölbchen Thymol, im dritten 0,2%ige Blausäure zu und erwärmte alle Kölbchen 7 Tage lang auf 35—40°, nachdem Kölbchen I kurze Zeit bis nahe zu 100° erhitzt worden war. Bei den Asparaginbestimmungen erhielt ich folgende Zahlen:

		Gekocht	Nicht gekocht	
		I	II	III
nach Sachsse		mit Thymol	mit Thymol	mit 0,2% HNC
berechnet <sup>1)</sup> in %		7,02 %	9,00 %	11,80 %
in Krystallen	{ aus 20 g	0,676 g	0,660 g	0,742 g
erhalten	{ in %	3,38 %	3,30 %	3,71 %

Wie man sieht, erhielt ich aus den Kolben II und III nicht wesentlich mehr Asparaginkristalle als aus Kolben I.

Alle auf diesem Wege gewonnenen Präparate besaßen das Aussehen des Asparagins und gaben die für dasselbe charakteristischen Reactionen (Bildung von Ammoniak beim Kochen mit Salzsäure und Natronlauge, Entstehen eines krystallinischen Niederschlages nach Sättigen der heissen wässerigen Lösung mit Kupferoxydhydrat). Vollkommen rein waren aber die aus Kolben II und III gewonnenen Krystalle nicht: es wurde durch Millon'sches Reagens eine Beimengung von Tyrosin nachgewiesen.

<sup>1)</sup> Die Daten für diese Berechnung sind aus einem vorher beschriebenen Versuche mit derselben Substanz und unter denselben Bedingungen erhalten worden.

sirt. Die Ausbeute betrug dabei 0,656 g (3,28%), und die Krystalle zeigten einen Wassergehalt von 12,09% (theoretisch 12%).

## Versuch II.

Für den Versuch II wurden 3tägige Lupinenkeimlinge verwendet. Es wurden zwei Proben der Substanz genommen (sie wurde in diesem Falle nicht wie bei den vorangegangenen Versuchen vorher mit Aether behandelt) und zu jeder 100 ccm. Wasser hinzugefügt; eine derselben wurde aufgeköcht und beide hierauf mit so viel Blausäure versetzt, dass eine 0,2%ige Lösung entstand.

Der ganze Versuch wurde im Uebrigen genau so angestellt wie der zuerst beschriebene.

Das Resultat des Versuches war folgendes:

Nach 7tägigem Stehen im Thermostaten

		gekocht	nicht gekocht
Nach Sachsse berechnet		5,72 %	—
in Krystallen	{ aus 20 g	0,492 g	0,658 g
erhalten	{ in %	2,46 %	3,29 %

Beide Präparate gaben sämmtliche früher erwähnte Reactionen des Asparagins. Ausserdem zeigte das Präparat aus der nicht gekochten Flüssigkeit eine Beimengung von Leucin und Tyrosin. Beim Behandeln desselben mit heissem Alkohol unter Zusatz von Ammoniak wurde eine alkoholische Lösung erhalten, aus der beim Stehen über Schwefelsäure eine kleine Menge einer Substanz sich ausschied; beim Erhitzen im Röhrchen gab dieselbe ein Sublimat unter gleichzeitigem Auftreten eines Amylamingeruches. Dieselbe Substanz gab mit Millon'schem Reagens eine rothgefärbte Lösung, was auf Anwesenheit von Tyrosin deutet. In dem Präparat aus der gekochten Flüssigkeit konnte eine Beimengung der genannten Amidosäuren nicht nachgewiesen werden.

## Versuch III.

Versuch III wurde ähnlich dem Versuche II angestellt, mit dem einzigen Unterschiede, dass die Ausscheidung des Asparagins durch einfaches Fällern mit Mercurinitrat erfolgte

und das Filtrat vom Mercurinitratniederschlag nicht wie bei den ersten Versuchen neutralisirt wurde. Von den vier zur Untersuchung herangezogenen Proben wurden zwei, bevor sie in den Thermostaten mit den beiden anderen gestellt wurden, aufgekocht.

Asparagin erhalten:

	Gekocht	Nicht gekocht
Aus 20 g	0,623 g	0,293 g
a) in %	3,14 %	1,47 %
Aus 20 g	0,675 g	0,324 g
b) in %	3,38 %	1,62 %

Auch in diesem Falle enthielten die Krystalle aus der nicht gekochten Flüssigkeit eine kleine Beimengung von Tyrosin; dasselbe wurde im Rückstand, den die Krystalle nach vorsichtiger Behandlung mit schwach erwärmtem Wasser gaben, gefunden. Es war schwer in reinem, leicht in ammoniakhaltigem Wasser löslich und gab die Hoffmann'sche und die Piria'sche Reaction.

Wenden wir uns zu den Ergebnissen der eben beschriebenen Versuche, so finden wir in keinem einzigen Falle eine merkliche Erhöhung des Asparagingehaltes in Folge der Wirkung des Enzyms. Die Schwankungen der Asparaginmenge in den Versuchen I und II müssen als solche, die innerhalb der Genauigkeitsgrenzen der angewendeten Methode liegen, angesehen werden. Die Menge des Asparagins aus den nicht gekochten Flüssigkeiten war beim letzten Versuche bedeutend kleiner als aus den gekochten. Wahrscheinlich ist dies dem Umstand zuzuschreiben, dass die Flüssigkeit beim Versetzen mit Mercurinitrat nicht neutralisirt wurde, wodurch die Fällung keine vollständige war. Der Einfluss der Acidität des Reagens musste sich dabei stärker in der nicht gekochten Flüssigkeit zeigen, da wegen ihres grösseren Gehaltes an Substanzen, die durch Mercurinitrat fällbar sind,<sup>1)</sup> vom letzteren zur Lösung mehr zugesetzt werden musste. Die beiden ersten

---

1) Beim dritten wie auch bei den beiden ersten Versuchen gaben die nicht gekochten Flüssigkeiten beim Versetzen mit Mercurinitrat bedeutend grössere Niederschläge als die gekochten.



gehalt der nicht gekochten Flüssigkeit sich etwas geändert hatte, dies doch nur in unbedeutendem Maasse geschehen war.

Ich muss nun noch darauf aufmerksam machen, dass im Versuch I die aus den Bestimmungen nach Sachsse's Methode berechneten Asparaginnengen bedeutend grösser sind, als die aus den Mercurinitratniederschlägen abgeschiedenen Quantitäten. Dies macht es sehr wahrscheinlich, dass das beim Kochen mit verdünnter Salzsäure entstandene Ammoniak nur zum Theil aus Asparagin, zum Theil aber aus einer anderen Stickstoffverbindung abgespalten worden war. Ferner hat Sachsse's Methode für die nicht gekochten Flüssigkeiten (Kolben II und III) einen höheren Asparagin gehalt ergeben, als für die gekochte Flüssigkeit (Kolben I). Also scheint bei Einwirkung des Enzyms auf die Eiweissstoffe eine durch verdünnte Salzsäure unter Ammoniakbildung zersetzbare Verbindung, welche nicht Asparagin ist, zu entstehen.<sup>1)</sup> Denn, wenn diese Verbindung Asparagin wäre, so hätte doch wohl die Mercurinitratniederschläge aus den nicht gekochten Flüssigkeiten mehr Asparagin liefern müssen, als der Niederschlag aus der gekochten Flüssigkeit.

Wenn auch die von mir in diesen Versuchen und in den

---

1) Die oben in den Versuchen I und II angeführte Zusammenstellung der nach Sachsse berechneten Asparaginnengen mit den aus den Mercurinitratniederschlägen abgeschiedenen für die von mir untersuchten 3- und 4tägigen Lupinuskeimlinge lässt annehmen, dass auch in denselben Asparagin nicht das einzige bei der Behandlung nach Sachsse's Methode ammoniakliefernde Produkt ist; denn die Unterschiede zwischen den nach der Sachsse'schen Methode gewonnenen Werthen und der Menge des von mir in Krystallen erhaltenen Asparagins sind kaum allein auf die Ungenauigkeit der Methode zurückzuführen. E. Schulze hat schon längst die Meinung ausgesprochen, dass in den Pflanzen ausser Asparagin (und Glutamin) noch andere Körper, die bei der Bearbeitung nach der Sachsse'schen Methode Ammoniak liefern sich finden müssen. Vergl. E. Schulze und E. Kiesser, Landwirthschaftl. Vers.-Stat., Bd. XXXVI, 1889, S. 1, und E. Schulze und J. Bosshardt, Zeitschrift für physiol. Chem., Bd. IX, 1885, S. 435; auch E. Schulze, Landwirthschaftl. Jahrbuch, 1892, S. 105 und Zeitschr. für physiol. Chem., Bd. XXX, 1900, S. 241.

oben beschriebenen Versuchen mit Conglutin erhaltenen Resultate immer noch die Möglichkeit offen lassen, dass bei der Einwirkung des Enzyms auf die Eiweissstoffe Asparagin in kleiner Quantität entsteht, so schliessen sie doch vollständig die Annahme aus, dass die Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym mit einer starken Asparaginbildung verbunden ist. Die Frage, ob bei diesem Process überhaupt Asparagin entsteht, wird sich entscheiden lassen, indem man Eiweissstoffe mit Hülfe einer durch Dialyse gut gereinigten Enzymlösung in etwas grösserer Quantität zersetzt und sodann die Produkte untersucht. Die Isolirung des Asparagins bietet schon deshalb sehr geringe Schwierigkeiten, weil dieses Amid leicht durch Pergamentpapier diffundirt und auch aus stark verunreinigten Lösungen leicht auskrystallisirt.

Ich behalte mir vor, über diese Frage noch Versuche anzustellen.<sup>1)</sup>

1) Was diejenigen Produkte der Einwirkung des Enzyms anbetrifft, die nach Sachsse's Methode Ammoniak abspalten und die jedenfalls in ihrer Hauptmasse nicht aus Asparagin bestehen, so ist es wohl möglich, dass zu jenen Produkten ein anderes Amid, z. B. Glutamin, gehört. Es ist schon längst festgestellt, dass Glutaminsäure sich in beträchtlicher Menge bei Zerspaltung mehrerer Eiweissstoffe (besonders pflanzlichen Ursprungs) durch Säuren bildet. (Vergl. Ritthausen, Die Eiweisskörper der Getreidearten etc., 1872, S. 213.) In neuester Zeit hat Kutscher (Ueber das Antipepton, III. Mittheil., Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, 1899, S. 88) die Anwesenheit der Glutaminsäure auch in den Produkten der tryptischen Verdauung nachgewiesen. Vielleicht bildet sich zuerst Glutamin, welches später in glutaminsaures Ammonium übergeht. Bekanntlich erleidet Glutamin diese Umwandlung sehr leicht. Ich möchte an dieser Stelle nur noch bemerken, dass unter den Produkten der Selbstverdauung von Lupinenkeimpflanzen eine Substanz, die leichter als Asparagin Ammoniak abzuspalten scheint, vorhanden ist. Eine beträchtliche Menge des Stickstoffs der Verdauungsprodukte (ausser Ammoniak) konnte durch unmittelbares Kochen mit Magnesia in Form von Ammoniak abdestillirt werden, während Asparagin nach Angaben Bosshard's (Zeitschr. f. analyt. Chem., Bd. XXII, 1. c.) beinahe kein Ammoniak beim Kochen mit Magnesia abspaltet.

Hirschler (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. X, 1886, S. 302) und Stadelmann (Zeitschr. f. Biologie, Bd. 24, 1888) haben schon lange gezeigt, dass ein Theil des Stickstoffs der sich bei der Pancreasverdauung

pflanzensubstanz können wir vorläufig nur einige Beobachtungen mittheilen; wir hoffen aber dieselben durch weitere Untersuchungen vervollständigen zu können.

Was die Zwischenprodukte der Verdauung anbetrifft, so wurde schon früher erwähnt, dass bei dem im Dialysator angestellten Versuch mit der Substanz der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* in der äusseren Flüssigkeit des Dialysators die Anwesenheit von echten Peptonen<sup>1)</sup> durch die Biuretreaction

von Fibrin bildenden Produkten beim Kochen mit *Magnesia* in Form von Ammoniak abspaltet. Ob dasselbe den leicht zerspaltbaren Amidon angehört, oder bei der Verdauung als solches entsteht, ist bis jetzt noch nicht erklärt. Zunz (*Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. XXVIII, 1899, S. 132) beobachtete die Bildung von bei der Destillation mit *Magnesia* abspaltbarem Stickstoff auch bei der peptischen Verdauung. Jakoby (*Zeitschr. f. physiol. Chemie*, Bd. XXIX, 1900, S. 149) constatirte die Anwesenheit von leicht abspaltbarem Ammoniak auch in Produkten der Selbstverdauung des Leberbreis.

Wenn auch der sich leicht abspaltende Stickstoff der bei der Selbstverdauung der Lupinenkeimpflanzensubstanz entstehenden Produkte nicht dem Asparagin angehört, so kann man doch fragen, ob er wenigstens nicht diejenige Quelle bildet, aus der das letztere bei seiner Entstehung in den Keimpflanzen seinen Amidstickstoff entlehnt. Eine Zusammenstellung der Mengen, in welchen der nach Sachsse's Methode abspaltbare Stickstoff sich bei dem Eiweisszerfall in den Versuchen über die Selbstverdauung und in den Keimpflanzen bildet, zeigt aber, dass, wenn diese Beziehung auch stattfindet, so jedenfalls auf diese Quelle nur ein Theil des Amidstickstoffs des in den Lupinenkeimpflanzen vorhandenen Asparagins zurückzuführen ist. Die Mengen des oben genannten Stickstoffs betragen bei der Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz von *Lupinus luteus* und von *Lupinus angustifolius* ca. 15% (die bei den verschiedenen Versuchen gefundenen Werthe schwanken zwischen 10 bis 20%) des Stickstoffs der zerfallenen Eiweissstoffe, in den Keimpflanzen derselben Arten nach den von Merlis (*Landw. Vers.-St. Bd. 48*, 1897, S. 419) und von mir ausgeführten Versuchen ungefähr 40%. Die angeführte Zusammenstellung führt zur Annahme, dass in den Keimpflanzen zugleich mit der hydrolytischen Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym ein secundärer Process einer Umwandlung von fest gebundenem Stickstoff in locker gebundenen stattfindet.

<sup>1)</sup> Die Bestimmungen des Stickstoffgehaltes der äusseren Flüssigkeiten der Dialysatoren mit gekochtem und nicht gekochtem Inhalt haben gezeigt, dass im letzteren in Wirklichkeit eine Verdauung von Eiweiss-

nicht nachgewiesen werden konnte (wenn zu der verdauenden Flüssigkeit keine Salzsäure zugesetzt wurde). Das in diesem Falle erhaltene Resultat stimmt mit den Beobachtungen von Puriewitsch<sup>2)</sup> überein. Bei der Untersuchung der stickstoffhaltigen Produkte, die bei der Berührung der Lupinencotyledonen mit Wasser in dasselbe übergehen, fand er unter ihnen weder Eiweissstoffe noch Peptone, in Lösung befanden sich nur Amidverbindungen. Analoge Ergebnisse erhielten auch Geret und Hahn<sup>3)</sup> bei der Untersuchung der Produkte der Verdauung von Eiweisskörpern durch das Enzym des Hefepresssaftes; unter diesen wurden Leucin, Tyrosin und kleine Mengen von Albumosen aufgefunden; kein einziges Mal aber konnte die Anwesenheit von echten Peptonen, auch im Anfangsstadium der Verdauung, nachgewiesen werden. Auch bei der Autodigestion des Leberbreies, nach Angaben Salkowski's<sup>4)</sup> und Jakoby's,<sup>5)</sup> lässt sich Leucin, Tyrosin und etwas Albumosen, aber kein echtes Pepton nachweisen.<sup>6)</sup>

stoffen unter Bildung von durch Pergamentpapier diffundirbaren Produkten stattfand.

Ich gebe hier die in den Dialysaten gefundenen Stickstoffmengen an:

gekocht	nicht gekocht
0,902 g	1,215 g

Im einen wie im andern Dialysator waren je 20 g der Substanz von Lupinenkeimlingen.

2) Puriewitsch, Physiologische Untersuchungen über die Entleerung der Reservestoffbehälter. Pringsheims, Jahrbücher f. wissenschaftl. Botanik, Bd. 31, 1897. S. 1.

3) M. Hahn, Das proteolytische Enzym des Hefepresssaftes. Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 31, 1899, S. 200 und L. Geret und M. Hahn, Weitere Mittheilungen über das im Hefepresssaft enthaltene proteolytische Enzym. Ber. d. deutschen chem. Gesellschaft, Bd. 31, S. 2335.

4) E. Salkowski loc. cit.

5) Ch. Jakoby, Ueber die fermentative Eiweisspaltung und Ammoniakbildung in der Leber. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, 1900, S. 149.

6) W. Windisch und B. Schellhorn (l. c.) kommen auch zu dem Schlusse, dass bei der Verdauung der Eiweissstoffe der Gerste durch das Enzym des Malzes sich kein echtes Pepton bildet. Die genannten Autoren haben aber vor der Untersuchung der Lösung auf Pepton die-

zu den Amidosäuren in einigen Fällen ohne Bildung von echtem Pepton, oder, was wahrscheinlicher ist, geht die weitere Umwandlung der sich bildenden Peptone so rasch vor sich, dass ihre Anwesenheit nicht entdeckt werden kann. Es ist daher klar, dass das negative Resultat bei dem Versuche, Peptone bei der Verdauung von Eiweissstoffen nachzuweisen, noch kein genügender Grund ist, um auf die Abwesenheit des Enzyms in dem untersuchten Object zu schliessen, wie es oft gethan wird.

Was die durch Phosphorwolframsäure fällbaren Produkte anbetrifft, deren Stickstoffgehalt bei den Versuchen mit den Keimpflanzen von *Lupinus luteus* ca. 30% desjenigen der zerspaltenen Eiweissstoffe beträgt, so bleibt vorläufig die Frage über ihre Natur offen.

Ich führe hier nur die Resultate eines Versuches, der zur Aufklärung des Verhaltens dieser Produkte gegenüber Tannin und Bleiacetat angestellt wurde, an.

Genommen wurden 10 g der Substanz 4 tägiger Keimlinge von *Lupinus luteus* und 100 ccm. 0,2%iger Blausäure.

Nach fünftägigem Stehen im Thermostaten gab die Analyse folgende Resultate:

N im ungelösten Rückstande . . . . .	2,96 %.
N in den Niederschlägen mit Tannin und Bleizucker . . . . .	1,50 %.
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	1,35 %.
N des Ammoniaks im Phosphorwolframsäureniederschlag (durch Destillation mit Magnesia) . . . . .	0,12 %.

Für die ursprüngliche Substanz wurde gefunden:

N der Proteinkörper (durch Tannin und Bleizucker gefällt) . . . . .	6,88 %.
N im Phosphorwolframsäureniederschlag . . . . .	0,41 %.

Aus den angeführten Angaben ist ersichtlich, dass der Zerfall der Eiweissstoffe von der Bildung von Substanzen begleitet ist, die nicht durch Tannin und Bleizucker, dagegen durch Phosphorwolframsäure fällbar sind. Der Stickstoff dieser

selbe zur Entfärbung mit Thierkohle gekocht; bekanntlich absorbiert aber die letztere Peptone aus der Lösung. Das angegebene Verfahren könnte folglich auch dann zu negativen Resultaten führen, wenn die zu untersuchende Lösung Peptone enthielte.

Substanzen nach Abzug des Ammoniakstickstoffs beträgt 0,82 % und im Verhältniss zum Stickstoff der zerfallenen Eiweisskörper (2,42 %) ca. 34 %.

Man kann vermuthen, dass diese Substanzen Hexonbasen waren. Das thierische Trypsin, dem das in den Keimpflanzen enthaltene Enzym sich zu nähern scheint, bildet nach den Untersuchungen von Hedin<sup>1)</sup> und von Kutscher<sup>2)</sup> zugleich mit Amidosäuren auch Hexonbasen. Nach Jakoby<sup>3)</sup> entstehen basische Produkte auch bei der Autodigestion des Leberbreis. E. Schulze<sup>4)</sup> hat die Hexonbasen auch in den Cotyledonen der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* gefunden, wo sie zugleich mit Monoaminosäuren vielleicht auch als Produkte der Wirkung des von mir aus denselben Keimpflanzen isolirten Enzyms auftreten.

#### **Zusammenfassung der Resultate.**

Die von mir ausgeführten Versuche über die Selbstverdauung oder Autolyse der Keimpflanzensubstanz führen zu der Schlussfolgerung, dass in den Keimpflanzen von *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus*, *Vicia Faba* und *Ricinus major* ein proteolytisches Enzym enthalten ist, welches Eiweissstoffe zu spalten vermag, unter Bildung von Produkten, die nur zum

---

1) Hedin, Du Bois Reymond's Archiv für Physiologie, 1891, S. 273. Hedin isolirte aus den Produkten der pancreatischen Verdauung Lysin.

2) Kutscher, Ueber das Antipepton. I. Mittheilung, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXV, 1898, S. 195. II. Mittheilung, ebenda, Bd. XXVI, 1898/99, S. 110. Dieser Autor fand im «Antipepton» von Kühne Histidin und Arginin.

3) Ch. Jakoby, loc. cit. Nach den Beobachtungen des Verfassers gab die Phosphorwolframsäure im Filtrat von der Selbstverdauung unterworfenem Leberbrei nach der Entfernung der Eiweissstoffe und Albumosen einen bedeutenden Niederschlag auch in demjenigen Falle, wo das Ammoniak durch Kochen mit *Magnesia* entfernt wurde.

4) Arginin wurde von E. Schulze in den Keimlingen von *Lupinus luteus* noch früher gefunden; in neuester Zeit wies er daneben auch Histidin und Lysin nach. E. Schulze, Ueber das Vorkommen von Histidin und Lysin in Keimpflanzen, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVIII, 1899, S. 465.

Stauung für diese Schlussfolgerung liefern auch die Versuche, welche ich mit der durch Weingeist aus dem Glycerinextract aus Lupinuskeimpflanzen gefällten Substanz gemacht habe. Ein solches Enzym scheint nach meinen Versuchen auch in den Axenorganen der Keimpflanzen von *Lupinus luteus* sowie in den ungekeimten Samen von *Lupinus angustifolius*, hier vielleicht als Zymogen, enthalten zu sein. Meine Versuche haben also eine Bestätigung für Green's Angabe, dass in den Keimpflanzen von *Lupinus* und von *Ricinus* ein proteolytisches Enzym enthalten ist, geliefert. Bei den Versuchen über die Selbstverdauung der Keimpflanzensubstanz konnte ich in allen Fällen unter den durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Produkten des Eiweisszerfalls das Vorkommen von Substanzen nachweisen, welche beim Kochen mit verdünnter Salzsäure nach der Sachsse'schen Methode Ammoniak abspalten.

Das proteolytische Enzym der Lupinuskeimpflanzen wirkte schwächer in 0,1%iger Sodalösung und in 0,2%iger Salzsäure und bildete bei Gegenwart der letzteren hauptsächlich nur Produkte, die durch Phosphorwolframsäure fällbar waren. Die Wirksamkeit des Enzyms wurde erhöht durch Zusatz geringer Menge von Blausäure. Günstig wirkte z. B. 0,1%ige Blausäure; in 1,0%iger Blausäure war zwar die Wirksamkeit des Enzyms eine grössere, aber es bildete hier, ebenso wie in 0,2%iger Salzsäure, aus den Eiweissstoffen vorzugsweise Produkte, die durch Phosphorwolframsäure fällbar sind.

Ueber die Produkte, die bei der Spaltung der Eiweissstoffe durch das Enzym sich bilden, sind von Green nur wenige und zum Theil nicht einwandsfreie Angaben gemacht worden. Aus meinen Versuchen geht mit Sicherheit hervor, dass bei Einwirkung des Enzyms auf die Eiweissstoffe Leucin und Tyrosin entstanden. Dass neben diesen Produkten auch Asparagin sich bildete, was von Green vermuthet worden ist, vermochte ich nicht nachzuweisen. Als wahrscheinlich kann ich es dagegen bezeichnen, dass durch das Enzym auch basische Produkte (Hexonbasen) aus den Eiweissstoffen gebildet werden.

Die Zersetzung der Eiweissstoffe durch das Enzym ist eine so starke, dass man wohl kein Bedenken tragen kann, die mit der Keimung der Samen verbundene Eiweisszersetzung auf die Wirkung eines solchen Enzyms zurückzuführen.

Die Resultate meiner Versuche stehen in vollständiger Uebereinstimmung mit den Schlussfolgerungen, zu denen E. Schulze <sup>1)</sup> in Bezug auf die Eiweisszersetzung in den Keimpflanzen auf ganz anderem Wege gelangt ist, insbesondere auch mit der Schlussfolgerung, dass das Asparagin grösstentheils durch Umwandlung primärer Eiweisszersetzungsprodukte entsteht und also ein secundäres Produkt des Eiweissumsatzes ist.

Zum Schlusse erachte ich es als eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. E. Schulze an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank auszusprechen für das rege Interesse, welches er für diese Arbeit zeigte, sowie für seine liebenswürdige Bereitwilligkeit, mir stets mit Rath und That beizustehen.

---

<sup>1)</sup> Vergl. E. Schulze, Ueber den Umsatz der Eiweissstoffe in der lebenden Pflanze. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIV (1898), S. 18 und Bd. XXX (1900), S. 241.



# Quantitative Bestimmung der Hexonbasen in Heteroalbumose und Pepton.

Von

H. C. Haslam.

---

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 15. December 1900.)

---

Das Verhältniss der Propeptone und Peptone unter einander und zu den ursprünglichen Eiweisskörpern kann nur durch die quantitative Untersuchung der Spaltungsprodukte geklärt werden. Ich habe es daher unternommen, die von A. Kossel zum Theil in Gemeinschaft mit F. Kutscher ausgearbeiteten Methoden für die Bestimmung der Hexonbasen auf die Untersuchung dieser dem ursprünglichen Eiweiss nahestehenden Produkte zu übertragen.

Bekanntlich ist es heute noch nicht gelungen, die ersten Umwandlungsprodukte der Eiweisskörper durch die proteolytischen Enzyme mit voller Sicherheit von einander zu trennen. Am meisten Gewähr für chemische Individualität bietet scheinbar derjenige Körper, welchen man heute gewöhnlich als Heteroalbumose bezeichnet und der zuerst von Schwann,<sup>1)</sup> später von Meissner und Büttner als ein Niederschlag erhalten wurde, der sich beim Erhitzen von Verdauungslösungen auf 65—66° nach Ausfällung des Parapeptons und Metapeptons ausscheidet.<sup>2)</sup> Zum Vergleich mit der Heteroalbumose wählte ich das Pepton (im älteren Sinne des Worts), den von Meissner und Büttner als «c-Pepton», heute meist nach Kühne's

---

1) Müller's Archiv, 1836, S. 81 u. 133.

2) Zeitschrift für rationelle Medicin, Dritte Reihe, Bd. 12, S. 61.

Nomenclatur als «Deuteroalbumose» bezeichneten Körper.<sup>1)</sup> Beide Körper wurden aus Witte-Pepton gewonnen.

Man muss annehmen, dass die Peptone oder Deuteroalbumosen nicht ein chemisches Individuum darstellen, sondern dass sie aus einer Gruppe einander sehr ähnlicher Körper bestehen, die zum Theil aus Hetero-, zum Theil aus Protalbumose hervorgehen, und es ist bis jetzt nicht möglich gewesen, diese Gruppe in unzweifelhafte chemische Individuen aufzutrennen. Trotzdem hat die Untersuchung der «Deuteroalbumose» oder des «Deuteroalbumosegemisches» bei dem heutigen Zustand unserer Kenntnisse ein bedeutendes Interesse, weil man hoffen darf, durch diese Untersuchungen einen Beitrag zu der noch strittigen Frage über die Entstehung der Verdauungsprodukte zu liefern. Leider war ich gezwungen, diese Untersuchungen abubrechen, ehe ich die Analysen auf Heteroalbumosen verschiedener Darstellung und auf Protalbumose ausdehnen konnte.

Ueber das Verhältniss der Heteroalbumose zu der Protalbumose liegen aus letzter Zeit folgende Angaben von Pick<sup>2)</sup> vor: 1. die Heteroalbumose enthält «39 % des Gesamtstickstoffs in basischer Form», während die Protalbumose nur «25 % basischen Stickstoff» gibt. 2. Die Heteroalbumose «enthält die aromatische Gruppe nur zum kleinsten Theil in einer Form, die bei der Spaltung zur Tyrosin- oder Indigobildung führt», hingegen die Protalbumose «liefert sehr reichlich Tyrosin, resp. Indol und Skatol». 3. Die Heteroalbumose «liefert sehr reichlich Leucin und erhebliche Mengen Glycocoll», hingegen die Protalbumose «gibt nur wenig Leucin und kein Glycocoll».

Die «Deuteroalbumose» wurde aus Witte-Pepton nach Folin's Methode<sup>3)</sup> dargestellt. Nachdem die primären Albumosen als Kupferverbindungen entfernt waren, wurde die Deuteroalbumose mit Ammoniumsulfat ausgesalzen, wieder in Wasser gelöst und die Fällung durch Ammonsulfat wiederholt. Die Hauptmenge des Salzes wurde durch Dialyse entfernt. Zur

---

1) Bezüglich der neueren Litteratur sei auf die Lehrbücher von Hammarsten, Neumeister u. s. w. verwiesen.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 219.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 152.

ich die Flüssigkeit zunächst mit nicht überschüssigem Baryt auf dem Wasserbade, zuletzt fügte ich in der Kälte einen geringen Ueberschuss von Baryt hinzu und liess die Flüssigkeit im Vacuum über Schwefelsäure eindunsten.

Das erhaltene Präparat gab nur spurenweise Niederschlag mit Ferrocyankalium, enthielt 1,75% Asche und nach Kjeldahl 15,5% N, nach volumetrischer Bestimmung 15,9% N.

Für die Darstellung der Heteroalbumose aus Witte-Pepton wandte ich die Ausfällung durch Dialyse an, indem ich zum Theil die concentrirte filtrirte Lösung von Witte-Pepton direkt in die Dialysirschläuche einfüllte und den hierbei ausfallenden Niederschlag durch Auswaschen mit Wasser reinigte, zum Theil auch in der Weise, dass eine concentrirte Lösung von Witte-Pepton mit einer grossen Menge Wasser gemischt und der ausfallende Niederschlag auf Heteroalbumose verarbeitet wurde. Die Hauptmenge gewann ich nach der folgenden Methode,<sup>1)</sup> die eine bessere Ausbeute lieferte:

In eine 10%ige Lösung von Witte-Pepton wurde Kochsalz bis zur Sättigung eingetragen. Der hierdurch erzeugte Niederschlag wurde in Wasser gelöst und in einen Dialysirschlauch eingefüllt. Nach 48 Stunden war die Heteroalbumose als flockige, halb schleimige Masse am Boden abgeschieden. Die klare, darüber stehende Flüssigkeit wurde abgegossen und die Heteroalbumose in eine grosse Menge destillirtes Wasser gebracht. Nach einigen Stunden hatte sich die Heteroalbumose soweit abgesetzt, dass die Flüssigkeit abgetrennt werden konnte; der Bodensatz wurde jetzt auf ein Filter gebracht und sorgfältig mit destillirtem Wasser ausgewaschen.

Die so gewonnene Substanz hatte ein gelatinöses Aussehen und war in Wasser ein wenig löslich, etwas mehr beim Erwärmen. Ein Theil wurde andauernd mit Wasser ausgewaschen, doch selbst nach 12stündigem Waschen gab das Filtrat Eiweissreactionen. Die Heteroalbumose ist in der That

---

<sup>1)</sup> Vergl. Kühne und Chittenden, Zeitschrift für Biologie, Bd. 20 (N. F. Bd. 2), S. 31.

in Wasser etwas löslich und ich habe bisher bei keiner Behandlungsweise ein in Wasser völlig unlösliches Präparat erhalten. Durch Erhitzen wird die Heteroalbumose schnell in die sogenannte Dysalbumose übergeführt.

Für die Analyse wurden 38,38 g Deuteroalbumose und 23,2 g Heteroalbumose angewandt. Die Spaltung wurde durch siedende, verdünnte Schwefelsäure bewirkt.

Die Resultate ergeben sich aus folgenden Tabellen:

**Vertheilung des Stickstoffs.**

	Deuteroalbumose		Heteroalbumose	
Gesamtmenge . . . . .	100	—	100	—
A. Basenstickstoff . . . .	31,4	—	23,9	—
Davon a) in Ammoniak . .	—	5,3	—	4,4
b) in Histidin . . . .	—	2,7	—	4,0
c) in Arginin . . . .	—	14,8	—	10,9
d) in Lysin . . . .	—	8,6	—	4,6
B. Stickstoff in nicht bestimmter Form . . .	68,6	—	76,1	—
Davon Huminstickstoff in den Barytniederschlägen . .	—	6,5	—	14,8

**Gewichtsprocente.**

	Histidin	Arginin	Lysin	Ammoniak
Deuteroalbumose	1,5	7,1	6,9	0,98
Heteroalbumose	2,2	4,9	3,5	0,79

Die Ausscheidung der Huminsubstanzen erfolgte bei der Heteroalbumose in compacten Massen, bei der Deuteroalbumose war dies nicht der Fall.

Aus diesen Analysen folgt, dass in der Deuteroalbumose 7,4% des gesammten Stickstoffs als Harnstoff und 16,0% in Form der Diamidosäuren durch Spaltung gewonnen werden,

10,0% in den Diamidosäuren erhalten worden sind.

Diese Analysen ergeben, dass dem Unterschied in den Eigenschaften der Heteroalbumose- und der Deuteroalbumosegruppe auch ein Unterschied in der Zusammensetzung entspricht. Das untersuchte Präparat von Heteroalbumose enthält weniger Stickstoff in Form der Diamidosäuren und des Harnstoffs als Deuteroalbumose, während der in die Huminstoffe übergehende Stickstoffantheil ein weit grösserer und bei meiner Versuchsanordnung mehr als doppelt so gross ist, wie bei der Deuteroalbumose. Auch das relative Verhältniss der Basen zu einander ist ein durchaus verschiedenes. Bemerkenswerth ist besonders das Verhältniss des Histidins, dessen Menge in der Heteroalbumose beträchtlich grösser ist, wie in der Deuteroalbumose, während das Arginin und noch mehr das Lysin in der Deuteroalbumose überwiegt.

Es ist noch nicht angängig, aus diesen Zahlen einen allgemeinen Schluss auf die Zusammensetzung der Heteroalbumose zu ziehen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass ein nach Pick's Verfahren gewonnenes Präparat von Heteroalbumose eine andere Zusammensetzung und einen höhern Gehalt an Basenstickstoff besitzt als das meinige, andererseits wird man aber auch in Betracht ziehen müssen, dass entsprechend den Untersuchungen von Kutscher<sup>1)</sup> mindestens ein Theil des Huminstickstoffes bei den Arbeiten von Pick durch Phosphorwolframsäure niedergeschlagen worden ist und zu der Erhöhung des «Diaminostickstoffs» beiträgt. Hier müssen weitere Untersuchungen eine Aufklärung geben. Jedenfalls wird durch meine Analysen gezeigt, dass die quantitative Bestimmung der Hexonbasen bedeutende Unterschiede im Bau der peptonartigen Stoffe enthüllt.

Zum Schluss spreche ich Herrn Professor A. Kossel für die freundliche Unterstützung bei diesen Arbeiten meinen herzlichen Dank aus.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 215.

# **Chemische Untersuchungen über die Selbstgährung der Hefe.<sup>1)</sup>**

Von

**Fr. Kutscher.**

---

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 15. December 1900.)

---

Eine sehr auffällige Erscheinung vollzieht sich an gewaschener lebender Hefe, sobald man grössere, feucht gehaltene Mengen derselben bei höherer Temperatur sich selbst überlässt. Sie entwickelt dann, auch bei Abwesenheit von Zucker, längere Zeit reichlich Alkohol und Kohlensäure. Diesen Process, bei dem die Hefe jene flüchtigen Spaltungsprodukte, die wir auch bei der Vergärung des Zuckers durch Hefe entstehen sehen, auf Kosten ihrer eigenen Leibessubstanz erzeugen muss, hat man als Selbstgährung bezeichnet.

Der Vorgang ist seit langer Zeit bekannt und von Thénard, Pasteur und anderen Forschern, namentlich aber von Béchamp und Schützenberger näher studirt worden.

Béchamp und Schützenberger erkannten bereits, dass sich die Selbstgährung aus 2 getrennt verlaufenden Vorgängen zusammensetzen muss, da es bei der Selbstgährung nicht bloss zur Bildung von Kohlensäure und Alkohol kommt. Denn sie beobachteten, wie sich mit dieser Erscheinung eine Reihe anderer chemischer Reactionen verbinden, durch die sich in der der Selbstgährung überlassenen Hefe weit mehr in Wasser lösliche, diffusible Substanzen bilden, wie in frischer Hefe vorhanden sind.

---

<sup>1)</sup> Dieser Arbeit ist der Preis der Külz-Althoff-Stiftung zuertheilt worden.

und Schützenberger ein dem Eiweiss nahestehender Körper, der die grösste Aehnlichkeit mit dem Hemialbumin besass, das Schützenberger erhielt, wenn er verdünnte, siedende Schwefelsäure auf Albumin einwirken liess, dargestellt. Weiter gewannen sie aus dem wässerigen Extract, der der Selbstgährung überlassenen Hefe Tyrosin, Leucin, Butalanin, ferner die Alloxurbasen, Carnin, Sarkin, Xanthin und Guanin. Alle diese Körper fasst Schützenberger als unmittelbare Derivate albuminoider Substanzen auf. Die Erklärung, die Schützenberger für das Auftreten der eben genannten Substanzen gibt, lasse ich wörtlich folgen. Er schreibt darüber in den Gährungserscheinungen Theil II, S. 266: «Bei der Alkoholgährung wurde der Erscheinungen gedacht, die man an einer der Inanition überlassenen und feucht gehaltenen Hefe beobachtet; sie dürfen nur als wirkliche Verdauung von Protein-substanzen gedacht werden.» Schützenberger fasst danach das Tyrosin, Leucin etc. als Verdauungsprodukte der Protein-substanzen auf.

Um das Vorstehende kurz und scharf auszudrücken, hebe ich hervor, dass wir auf Grund der Arbeiten Schützenberger's die Selbstgährung der Hefe als einen Vorgang auffassen können, bei dem erstens ein Abbau der Kohlehydrate, die den Leib der Hefe zusammensetzen, zu Kohlensäure und Alkohol erfolgt. Zweitens greift aber die Hefe bei der Selbstgährung ihren Eiweissbestand an und zersetzt das Albumin bis zur Bildung krystallinischer Produkte. Diese letzte Erscheinung fasst Schützenberger als Selbstverdauung auf.

Da ich selbst mich nur mit jenem Theil der Selbstgährung befasst habe, der eine Zersetzung stickstoffhaltiger Körpersubstanz zur Folge hat, so will ich im Nachfolgenden nur die hierauf bezüglichen Veröffentlichungen aufführen.

Die Arbeiten Schützenberger's wurden durch Kossel weiter fortgesetzt und wesentlich gefördert. Denn wir verdanken Kossel die wichtige Erklärung über die Herkunft der Sarkinbasen, welche Schützenberger als Derivate des Albumins auffasste. Kossel stellte diese irrige Annahme

Schützenberger's richtig, indem er nachwies, dass dieselben aus dem in der Hefe reichlich vorhandenen Nuclein, das bei der Selbstgährung sich zersetzt, hervorgehen. Ebenso erkannte er das Nuclein als diejenige Substanz, die durch ihren Zerfall die Phosphorsäure liefert, welche man in den Extracten der der Selbstgährung überlassenen Hefe in beträchtlicher Menge findet.

Später sind von Salkowski die Versuche Schützenberger's wieder aufgenommen worden. Salkowski modifizierte die Methode, die Béchamp und Schützenberger benutzten, indem er an Stelle des Kreosotwassers, unter dem Béchamp und Schützenberger die der Selbstgährung überlassene Hefe hielten, Chloroformwasser benutzte. Bezüglich der stickstoffhaltigen löslichen Produkte, die er in den Extracten der unter Chloroformwasser gehaltenen Hefe fand, kam er zu denselben Resultaten wie Schützenberger und Kossel, indem er das Leucin und Tyrosin als Verdauungsprodukte von Proteinsubstanzen auffasste, die Alloxurbasen hingegen aus den Nucleinen der Hefe hervorgehen liess. Die Zahl der bei der Selbstgährung entstehenden löslichen und von Schützenberger isolirten Substanzen ist durch Salkowski nicht vermehrt worden.

Auf die Veröffentlichungen von Salkowski erfolgte lange keine Arbeit, die sich mit der Selbstgährung der Hefe befasste. Erst in letzter Zeit wurden von Hahn die Beobachtungen Schützenberger's und Kossel's auch auf den Hefepresssaft, der nach Buchner's Verfahren aus der Hefe gewonnen war, übertragen. Dabei beobachtete Hahn die gleichen Erscheinungen, wie Schützenberger und Kossel an der der Selbstgährung überlassenen Hefe. Das Eiweiss und die im Presssaft vorhandenen Nucleine werden sehr schnell angegriffen und vollkommen gespalten. Nach beendeter Zersetzung der genannten Körper fand er im Presssaft in reichlicher Menge Leucin und Tyrosin, freie Phosphorsäure und Nucleinbasen.

Damit glaube ich die wichtigsten Arbeiten, die die bei der Selbstgährung der Hefe erfolgende Spaltung ihrer Eiweisskörper und Nucleine verfolgen, aufgeführt zu haben.



stickstoffhaltiger Substanzen zu isoliren, die man bisher noch nicht bei der Selbstgährung der Hefe beobachtet hat. Dieselben sind, wie ich später zeigen werde, wohl geeignet, um Aufschluss über die Natur des Verdauungsvorganges zu geben, unter dessen Wirkung gleichzeitig die schon Schützenberger bekannten stickstoffhaltigen, wasserlöslichen Substanzen bei der Selbstgährung sich bilden.

Die Methode, deren ich mich bei meiner Arbeit bediente, gestaltete sich allmählich folgendermassen:

Möglichst frische Brauereihefe wurde mit eiskaltem Wasser gewaschen, bis dasselbe farblos ablief. Darauf wurde sie nach der Angabe E. Fischer's unter Toluolwasser gebracht und bei ca. 38° C. sich selbst überlassen. Zunächst tritt eine lebhaft Gährung und Gasentwicklung ein, die bei den verschiedenen Proben verschieden lange Zeit währen kann, in der Regel aber nach 24—48 Stunden völlig erloschen ist. Jetzt beginnt die Hefe sich zu sedimentiren und nach einigen Tagen steht eine klare, deutlich sauer reagirende Flüssigkeit über einem dünnen Bodensatz der toten Hefezellen. Zunächst gibt die Flüssigkeit noch lebhaft Biuretreaction, doch verschwindet diese in ca. 8—14 Tagen vollkommen oder bis auf Spuren. Während man die Flüssigkeit ziemlich schnell frei von biuretgebender Substanz erhält, ist dies bei dem Rückstand nicht der Fall. Er gibt die Biuretreaction weit länger, und auch dann, wenn man ihn öfter aufrührt, gelingt es zuweilen nicht, einen Rückstand zu bekommen, der keine Biuretreaction mehr zeigt.

Ich habe derartige Proben nicht weiter verarbeitet, sondern nur solche benutzt, in denen sowohl Flüssigkeit wie Rückstand schnell von biuretgebender Substanz frei wurden, da ich hoffen konnte, in diesen Proben keine schmierigen Zwischenprodukte anzutreffen, welche die Isolirung der krystallinischen Verdauungsprodukte hindern mussten. Um genügend an den einzelnen Verdauungsprodukten zu erhalten, ist es nothwendig, mindestens 3—4 Liter frischer Hefe zu verarbeiten.

In meinem nachstehend geschilderten Hauptversuch benutzte ich 3 Liter einer frischen, untergährigen Hefe. Dieselbe bildete, als ich sie aus der Brauerei erhielt, eine Masse, die die Consistenz von dünnem Kleister besass. Sie liess sich leicht ohne grossen Verlust durch Decantation auswaschen. Nach dem Auswaschen liess ich die Hefe sich absetzen und schwemmte sie mit 5 Liter Toluolwasser in ein verschliessbares Gefäss, das bis zum Ablauf der Gasentwicklung nur leicht bedeckt im Brutschrank bei 38° C. stehen blieb. Darauf wurde es fest geschlossen und die Hefe unter öfterem Umschütteln so lange sich selbst überlassen, bis Flüssigkeit und Rückstand keine Biuretreaction mehr gaben.<sup>1)</sup> Danach liess ich in der Kälte absetzen, heberte die klare Flüssigkeit vom Bodensatz ab, wusch denselben dreimal mit Toluolwasser durch Decantation aus, vereinigte die erste Flüssigkeit mit dem Waschwasser und fällte das Ganze mit Barytwasser. Vom Baryumphosphat wurde abfiltrirt, das Filtrat durch Schwefelsäure annähernd vom überschüssigen Baryt befreit. Die Flüssigkeit wurde jetzt mit Essigsäure schwach angesäuert und stark concentrirt. Es schied sich zunächst Tyrosin in reichlicher Menge ab. Dieses wurde abgesaugt, mit möglichst wenig Wasser ausgewaschen und das neue Filtrat mit wenig verdünnter Salpetersäure versetzt. Darauf wurde ihm so lange 20%ige Silbernitratlösung zugefügt, als ein Niederschlag entstand. Von der sehr voluminösen Fällung wurde nach 48 Stunden abfiltrirt. Ich will diese Fällung als Fällung I, das Filtrat davon als Filtrat I bezeichnen.

#### **Fällung I.**

Die Fällung I musste die Alloxurbasen, welche bei der Selbstgährung der Hefe aus den Nucleinen hervorgehen, enthalten, und zwar in Form der schwer löslichen salpetersauren Silberverbindungen. Um dieselben in die salpetersäurefreien Silberverbindungen der Alloxurbasen überzuführen, schwemmte ich Fällung I in überschüssigem Ammoniakwasser auf, fügte demselben etwas ammoniakalische Silberlösung zu und brachte das Ganze in einen verschliessbaren Kolben, in dem ich es

---

<sup>1)</sup> Dies war nach 14 Tagen erreicht.

Silberlösung keine Fällung. Der auf dem Filter verbleibende Rückstand musste demnach die Alloxurbasen enthalten. Ich will zunächst die Verarbeitung des die Alloxurbasen enthaltenden Rückstandes, danach die Behandlung der davon abgesaugten Flüssigkeit angeben.

#### Rückstand.

Um aus dem Rückstand die Alloxurbasen zu isoliren, benutzte ich das in letzter Zeit von Krüger und Salomon angegebene Verfahren. Die auf dem Filter verbleibenden Silberverbindungen wurden mit Salzsäure zersetzt, vom Chlor-silber wurde abfiltrirt, das Filtrat zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in zwei Fractionen, die Xanthin- und Hypoxanthinfraction, getrennt.

In der Xanthinfraction war nur eine geringe Menge schmieriger Substanz hinterblieben, und alle meine Versuche, dieselbe nach den Angaben von Krüger und Salomon aufzulösen, scheiterten. Ich erhielt aus derselben weder Xanthin, noch sonst eine Base der Xanthinfraction.

Die Hypoxanthinfraction dagegen liess auf Zusatz von Ammoniak einen reichlichen Niederschlag fallen, aus dem sich reines salzsaures Guanin gewinnen liess, das auf Zusatz von  $\text{NH}_3$  die freie Base lieferte.

#### Analyse:

0,127 g der freien Base lieferten bei der Verbrennung 50,4 ccm. N.  
 $T = 11^\circ \text{ C.}$ , Ba 748 mm. Hg.

Für  $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}_5\text{O}$

Berechnet  
N = 46,40 %

Gefunden  
N = 46,60 %.

Das Filtrat von der Guaninfällung wurde mit Pikrinsäure versetzt. Die entstehende reichliche Fällung wurde sofort abgesaugt und aus Wasser umkrystallisirt. Da sich die Verbindung nicht wie das pikrinsaure Adenin in langen Nadeln, sondern körnigen Krystallwarzen abschied, wurde sie nochmals in siedendem Wasser gelöst und mit Thierkohle behandelt. Jetzt fiel sie in

langen verfilzten Nadeln aus. Ihre Analyse gab nachstehende Werthe.

0,1344 g der bei 120° C. bis zur Gewichtsconstanz getrockneten Substanz gaben bei 11° C. 36,6 ccm. Stickstoff.

Für  $C_8H_5N_5 \cdot C_6H_5[NO_2]_3OH$

Berechnet  
N = 30,77%

Gefunden  
N = 31,3%

Die Mutterlaugen vom Adeninpikrat mussten den Rest der Alloxurbasen der Hypoxanthinfrac-tion enthalten. Sie wurden vereinigt, mit Schwefelsäure angesäuert, von der überschüssigen Pikrinsäure durch Benzol befreit und darauf mit Kupfersulfat und Natriumbisulfat gefällt. Die Fällung war eine geringe. Sie wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt und eingeeengt, bestand aber nur aus etwas Adenin, das der ersten Fällung durch Pikrinsäure entgangen war. Heteroxanthin etc. liess sich auch nicht in Spuren nachweisen. Die Ausbeute an salzsaurem Guanin hatte 0,9 g, die an Adeninpikrat 1,40 g betragen. Eine nicht beträchtliche Menge Adenin habe ich dann noch in einer andern Fraction, als der eben beschriebenen, gefunden. Dasselbe war jedenfalls begleitet von Spuren von Guanin. Ich werde an geeigneter Stelle hierauf zurückkommen.

Es hatten sich also in meinem Hauptversuch von den Alloxurbasen nur Guanin und Adenin isoliren lassen. Diese Verhältnisse werden sich wahrscheinlich nicht immer gleichmässig finden, sondern einem starken Wechsel unterworfen sein, je nachdem man die überlebenden Hefezellen oder die getödteten der Selbstgährung überlässt, ferner wird die Dauer der Selbstgährung und die Temperatur, bei der sie verläuft, nicht ohne Einfluss auf die bei der Selbstgährung sich bildenden und restirenden Alloxurkörper sein.

Wir verdanken die ersten Versuche, welche uns über diese Fragen aufklären, Viktor Lehmann, einem Schüler Kossel's. Derselbe konnte an überlebender, der Selbstgährung überlassener Hefe eine schnelle Abnahme der Alloxurkörper feststellen. Das Gleiche hat dann auch Salkowski an Hefe, die er unter Chloroformwasser hielt, und Hahn am Hefepresssaft nachweisen können. Ob die Alloxurkörper schliesslich

liefern uns die Versuche von Lehmann, Salkowski und Hahn keinen Aufschluss. Auch mein Versuch, in dem ich Hefe so lange der Selbstgährung überliess, bis die biuretgebende Substanz in ihr vollkommen zersetzt war, gibt keine endgültige Antwort auf die aufgeworfene Frage, da ich ebenfalls noch Alloxurkörper nachweisen konnte. Allerdings scheint aus meinem Versuch hervorzugehen, dass die Basen der Xanthin-fraction wenigstens, bei der Selbstgährung der Hefe vollkommen zersetzt werden können. Im Uebrigen steht der Befund der von mir an der Hefe bezüglich des Verhaltens der Alloxurbasen gegen eine energische und lange fortgesetzte Selbstgährung erhoben worden ist, in guter Uebereinstimmung mit den Beobachtungen, die ich bei der Selbstverdauung des Pankreas machen konnte. Auch hierbei werden bekanntlich die Alloxurbasen frei und darauf wahrscheinlich zersetzt. Als Hauptmasse der restirenden Alloxurbasen fand ich, genau wie bei meinem Versuche mit der Hefe, bei der Selbstverdauung des Pankreas Guanin und Adenin.

#### Filtrat.

Das stark ammoniakalische Filtrat von dem Rückstand, der mir das Adenin und Guanin geliefert hatte, stumpfte ich mit Salpetersäure bis zur schwach ammoniakalischen Reaction ab. Es entstand dabei ein reichlicher Niederschlag. Derselbe wurde abgesaugt, mit Wasser gewaschen, darauf in Wasser fein vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Schwefelsilber wurde abfiltrirt, das Filtrat bei mässiger Temperatur auf ca. 500 ccm. gebracht, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der reichliche Niederschlag wurde abfiltrirt, mit verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen und mit Baryt zersetzt. Das Filtrat vom phosphorwolframsauren Baryt wurde zunächst durch Kohlensäure von dem überschüssigen Baryt befreit, eingeeengt und die letzten Mengen des Baryts, der sich durch Kohlensäure nicht ganz hatte abscheiden lassen, durch Schwefelsäure herausgeschafft. Die barytfreie Flüssigkeit wurde zum dünnen Syrup

eingengt. Nach einiger Zeit schied sich aus demselben eine zu Drusen vereinigte, in kleinen Nadeln krystallisirende Substanz ab. Dieselbe fiel, nachdem sie einmal aus Wasser umkrystallisirt war, nicht mehr mit Silbernitrat bei saurer Reaction, auch bei neutraler Reaction des Lösungsmittels wurde sie durch Silbernitrat nicht niedergeschlagen. Sie musste also nur in die Fraction der Alloxurbasen mitgerissen worden sein. Ammoniakalische Silberlösung dagegen erzeugte mit ihr eine reichliche Fällung, die sehr leicht in Salpetersäure, und überschüssigem Ammoniak löslich war. Behandelte man ein wenig von dem Körper mit verdünnter siedender Salpetersäure, so lieferte er jetzt auch bei stark saurer Reaction der Flüssigkeit mit Silbernitrat eine reichliche, amorphe Fällung, die sich in siedender Salpetersäure löste und nach dem Erkalten in feinen Nadeln ausfiel. Der Körper reagirte gegen Lakmus neutral und gab bei der Analyse nachstehende Werthe:

0,1176 g der bei 130° C. getrockneten Substanz gaben bei der Verbrennung 26,0 ccm. Stickstoff.  $T = 11,5^{\circ}$  C., Bar. 745 mm. Es entspricht das 25,84% N.

0,1472 g gaben bei der Verbrennung 0,0336 g Wasser und 0,233 g Kohlensäure. Daraus berechnen sich 2,55% H und 43,18% C.

0,1412 g gaben bei der Verbrennung 0,0327 g Wasser und 0,223 g Kohlensäure. Daraus berechnen sich 2,60% H und 43,08% C.

Berechne ich aus den gefundenen Werthen den einfachsten Formelausdruck, so würde dem analysirten Körper die Formel  $C_8H_6N_4O_4$  zukommen.

Für $C_8H_6N_4O_4$			
Berechnet	Gefunden		
	I	II	
C = 43,24%,	43,18%,	43,08%,	
H = 2,7 %	2,55 %	2,6 %.	
N = 25,23 %	25,84 %	—	

Das Filtrat der Phosphorwolframfällung, die mir den eben geschilderten Körper geliefert hatte, wurde von mir ebenfalls untersucht, doch kam ich nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure nur zu einem Syrup, der sich nicht weiter zugänglich erwies.

Ich wende mich nunmehr dem Filtrat I wieder zu, d. h. der Flüssigkeit, die man erhält, wenn man nach Abscheidung des Tyrosins die Verdauungsflüssigkeit der Hefe zur Gewinnung der Alloxurbasen bei schwach salpetersaurer Reaction mit Silbernitrat fällt und die Fällung abfiltrirt. Diesem fügte ich noch soviel einer 20%igen Silbernitratlösung zu, bis eine Probe gegen Barytwasser nicht nur weisse organische Silberverbindungen, sondern gleichzeitig braunes Silberoxyd fallen liess. Nunmehr gab ich vorsichtig gesättigte kalte Barytlösung so lange zu, bis eine von dem reichlich entstehenden Niederschlag klar filtrirte Probe mit ammoniakalischer Silberlösung nur mehr eine schwache Trübung erzeugte. Die starke Fällung, die sich auf diese Weise erzielen liess, wurde abfiltrirt. Ich will diese Fällung als Fällung II und das Filtrat davon als Filtrat II bezeichnen.

In Fällung II müssen, wenn man in der Weise, wie eben angegeben ist, verfährt, alle diejenigen löslichen Substanzen, bis auf geringe Reste, hineingehen, welche sich auch durch ammoniakalische Silberlösung niederschlagen lassen würden. Doch gewährt das von mir benutzte Verfahren den Vortheil, dass das Filtrat von der Fällung II ammoniakfrei bleibt. Um das in Fällung II steckende Gemenge verschiedener Körper aufzutheilen, verfuhr ich folgendermassen:

#### **Fällung II.**

Fällung II wurde gut ausgewaschen, darauf in Wasser vertheilt und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Schwefelsilber wurde abfiltrirt, das neue Filtrat bei mässiger Temperatur auf ca. 500 ccm. gebracht, mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt.

#### **Phosphorwolframfällung.**

Die Phosphorwolframverbindungen werden durch Baryt zersetzt und nach Abscheidung des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure die freien Basen durch ammoniakalische Silberlösung vorsichtig ausgefällt. Die Silberverbindungen wurden mit HCl zersetzt und bei geringer Temperatur die erhaltenen

Flüssigkeiten zum dünnen Syrup eingeengt. Sehr bald krystallisirt meist gleich nach dem Erkalten in kleinen Drusen eine Substanz, die von mir zuerst als salzsaures Histidin angesprochen wurde und die ich bei allen meinen Verdauungsversuchen erhalten habe. Die Ausbeute war eine schwankende, stets aber geringe, so dass ich zur Analyse die in meinen früheren Versuchen erhaltenen Mengen der im Hauptversuch gewonnenen Substanz zufügen musste. Trotzdem verfügte ich schliesslich nur über ca. 0,5 g Substanz. Ich versuchte zunächst dieselbe durch eine Chlorbestimmung zu identificiren. Zu diesem Zwecke löste ich 0,154 g Substanz, die bei 110° C. nichts an Gewicht verloren hatte, in Wasser, fügte Salpetersäure zu und gab Silbernitrat bei. Der reichlich entstandene Niederschlag war gallertig, wie man ihn von Alloxurbasen erhält, und nicht lichtempfindlich. Eine kleine Probe erwies sich in überschüssigem Ammoniak unlöslich, löslich dagegen in siedender Salpetersäure, aus der er beim Erkalten in Nadeln wieder ausfiel. Danach lag eine Alloxurbase vor, die mit in die Fällung II gerathen war. Um festzustellen, welche derselben es sei, krystallisirte ich die amorphe Silberverbindung, die ich aus den 0,154 g erhalten, aus siedender Salpetersäure, der ich ein wenig Harnstoff beigelegt hatte, um. Die Silberverbindung wurde abfiltrirt, im Vacuum getrocknet und das Silber bestimmt.

0,1524 g gaben 0,061 g Silber d. h. 40,03 %.

Die gefundene hohe Silberzahl sprach dafür, dass die Silberverbindung des Adenins vorlag, welche bekanntlich ein Gemenge von  $C_5H_5N_5 \cdot AgNO_3$  und  $C_5H_5N_5 \cdot 2AgNO_3$  ist. Davon würde  $C_5H_5N_5 \cdot AgNO_3 = 35,41\%$  Ag,  $C_5H_5N_5 \cdot 2AgNO_3 = 45,47\%$  Ag verlangen.

Um endgültig festzustellen, welche Alloxurbase hier vorlag, führte ich den Rest der mir verbliebenen salzsauren Verbindung durch Ammoniak in die freie Base über.

Davon gaben 0,1196 g bei der Verbrennung 51,0 ccm. Stickstoff bei  $T = 10^\circ C.$ , Bar. 750 mm.

Für  $C_5H_5N_5$

Berechnet  
N = 51,89 %

Gefunden  
N = 50,60 %.



lich hinter dem berechneten zurückblieb, glaube ich doch, die von mir analysirte Verbindung als Adenin ansprechen zu dürfen, das mit einer anderen stickstoffärmeren Alluxarbase (wahrscheinlich Guanin) verunreinigt war. Dass in Wirklichkeit Guanin oder Xanthin der von mir analysirten Base beigemengt war, zeigte sich, als ich mit ihr die Weidel'sche Reaction anstellte. Sie gab dabei eine deutliche Rothfärbung.

Die Mutterlauge von der eben geschilderten Substanz erwies sich lange Zeit sehr spröde und wollte von krystallinischen Körpern nichts hergeben, bis ich schliesslich den schmierigen Syrup, den sie bildete, mit concentrirter Salzsäure aufnahm und über Schwefelsäure langsam eindunsten liess. Bei dieser Behandlung verwandelte sie sich in eine feste, aus grossen glänzenden Krystallen zusammengesetzte Masse. Die letzten Schmierien liessen sich durch etwas concentrirte Salzsäure, in der die Krystalle nur wenig löslich waren, von denselben abspülen. Die Krystalle wurden darauf mit absolutem Alkohol gewaschen und im Vacuum getrocknet. Eine Chlorbestimmung derselben gab nachstehendes Resultat:

0,1542 g gaben 0,193 g AgCl.

Für  $C_6H_7N_3O_2 \cdot 2 HCl$

Berechnet  
C = 31,14%

Gefunden  
C = 31,0%.

Nach dieser Analyse lag das Histidindichlorid vor.

Um ganz sicher die Verbindung als eine Histidinverbindung zu erweisen, führte ich einen Theil derselben wieder in die Silberverbindung über. Dieselbe wurde im Vacuum zur Gewichtsconstanz gebracht und eine Silber- und Stickstoffbestimmung in ihr vorgenommen.

Es gaben 0,1236 g an Silber 0,0686.

0,119 g sättigten, nach Kjeldahl behandelt, 9,1 ccm.  $\frac{1}{10}$  N.-Oxal.

Für  $C_6H_7Ag_2N_3O_2 + H_2O$

Berechnet  
Ag = 55,81%  
N = 10,85%

Gefunden  
Ag = 55,50%  
N = 10,72%.

Die Ausbeute an Histidindichlorid betrug ca. 0,8 g.

Das Filtrat der Phosphorwolframsfällung wurde durch Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und durch Schwefelsäure genau vom Baryt befreit. Danach wurde zum Syrup eingengt. Derselbe reagierte stark sauer und erstarrte in meinem Hauptversuch zu einem weichen Krystallbrei. Um denselben in seine einzelnen Bestandtheile zu zerlegen, nahm ich ihn von Neuem mit Wasser auf und übersättigte ihn siedend heiss mit Zinkoxyd. Ich habe an anderer Stelle nachgewiesen, dass es leicht gelingt, durch das Zinksalz Asparaginsäure und Glutaminsäure, die ich in dem vorliegenden Falle unter den in die Silberfällung eingegangenen Säuren vermuthete, zu trennen, denn die Glutaminsäure bildet ein in Wasser sehr schwer lösliches, gut krystallisirendes Salz, während das asparaginsaure Zink leicht löslich und nicht krystallisirbar ist. Um also aus dem Säuregemenge die Glutaminsäure zunächst abzuscheiden, fügte ich demselben Zinkoxyd im Ueberschuss zu. Nach 48 Stunden wurde filtrirt, der auf dem Filter verbliebene Rückstand, der neben dem ungelösten Zink auch das glutaminsaure Zink enthalten musste, wurde in Essigsäure gelöst und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Es liess sich aber schliesslich nur eine geringe Menge stark gefärbter Schmiere gewinnen. Aus derselben vermochte ich auf keine Weise Glutaminsäure darzustellen. Auch schon in zwei Vorversuchen, in denen ich die Trennung von Asparagin- und Glutaminsäure noch nach dem unvollkommeneren Verfahren von Ritthausen versucht hatte, war es mir nicht geglückt, Glutaminsäure unter den Produkten der Selbstgährung der Hefe aufzufinden. Doch möchte ich mich noch nicht endgültig dahin äussern, dass Glutaminsäure bei der Selbstgährung der Hefe nicht entsteht, wenn es mir auch nach meinem letzten Versuch wahrscheinlich ist.

Das mit Zink gesättigte Gemenge der Säuren wurde nunmehr zunächst durch Schwefelwasserstoff vom Zink befreit und darauf mit kohlensaurem Kupfer in der Siedehitze gesättigt. Nach genügender Concentration schied sich in Masse das

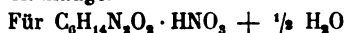
saure ab. Es wurden gewonnen 6,2 g lufttrockenes Kupfersalz. Die Mutterlauge des asparaginsäuren Kupfers war nach der vollkommenen Abscheidung des asparaginsäuren Kupfers nicht mehr blau, sondern grün gefärbt. Sie lieferte nach der Entkupferung einen stark sauren Syrup, der keine Neigung zur Krystallisation zeigte.

#### Filtrat II.

Filtrat II wurde nach Zugabe von etwas Silbernitratlösung mit Baryt gesättigt. Der entstehende Niederschlag, Fällung III, wurde abfiltrirt, mit Barytwasser gewaschen, darauf in Wasser aufgeschwemmt und nach Zufügung von etwas Schwefelsäure mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Vom Schwefelsilber wurde abfiltrirt, das Filtrat wurde von der Schwefelsäure durch Baryt befreit, danach mit Salpetersäure genau neutralisirt und zum dünnen Syrup eingengt. Derselbe krystallisirte bis auf den letzten Tropfen. Die Krystallisation bestand aus neutralem rechtsdrehendem Argininnitrat.

#### Analyse.

0,294 g der im Vacuum getrockneten Substanz gaben bei der Verbrennung 72,0 ccm. N bei 13° C. und 742 mm. Ba. Als Sperrflüssigkeit diente 25%ige Kalilauge.



Berechnet	Gefunden
N = 28,45 %	N = 28,31 %.

Aus 3 Liter Hefe liess sich ca. 12 g reines Argininnitrat gewinnen.

#### Filtrat III.

Das Filtrat von Fällung III wurde in der Kälte durch Zugabe von Schwefelsäure vom Baryt und durch Salzsäure vom Silber befreit. Darauf wurde es mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die sehr reichliche Fällung wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure sorgfältig gewaschen und mit Baryt zersetzt. Von den unlöslichen Barytverbindungen wurde abfiltrirt, das Filtrat durch Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit, zum dünnen Syrup eingengt, und derselbe nach den Angaben

Kossel's mit Pikrinsäure behandelt. Das abgeschiedene Pikrat war, wie die Analyse ergab, Lysinpikrat. Die Ausbeute war eine sehr reichliche. Sie betrug für 3 Liter Hefe ca. 14 g reines Lysinpikrat.

#### Analyse.

Es gaben 0,223 g der über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Substanz bei der Verbrennung 0,089 g Wasser und 0,313 g Kohlensäure.

Für  $C_6H_{14}N_2O_4 \cdot C_6H_5N_2O_7$

Berechnet	Gefunden
H = 4,53 %	H = 4,47 %
C = 38,40 %	C = 38,30 %

In 2 getrennten Versuchen überzeugte ich mich weiter von der Bildung von Ammoniak während der Selbstgährung, indem ich einen Theil der klar filtrirten Flüssigkeit, in der sich die Selbstgährung vollzogen hatte, mit Baryt resp. Magnesia destillirte. In beiden Fällen wurde Ammoniak übergetrieben, doch ist die Destillation mit Baryt vorzuziehen, da einer Bildung von phosphorsaurer Ammoniakmagnesia vorgebeugt wird.

Es hatten sich also neben den bisher bekannten stickstoffhaltigen Substanzen, die bei der Selbstgährung der Hefe sich bilden, den Sarkinbasen, dem Leucin, dem Tyrosin, noch Ammoniak, Histidin, Arginin, Lysin, Asparaginsäure und eine Substanz der Formel  $C_6H_6N_4O_4$  nachweisen lassen. Zu den gleichen Resultaten kam ich, wenn ich die Flüssigkeit, in der die Selbstgährung stattfand, durch Zugabe von Natriumcarbonat schwach alkalisch hielt.

Von den aufgezählten Spaltungsprodukten, die bei der Selbstgährung durch Verdauung der Proteinsubstanzen entstehen, ist aber besonders das Auftreten der Hexonbasen charakteristisch für die Wirkungsweise eines Enzyms, das bei der Selbstgährung der Hefe thätig sein muss, nämlich für das Trypsin.

Dass ein proteolytisches Enzym in der Hefe vorhanden ist, ergaben schon die Versuche von Béchamp und Schützenberger, in denen dieselben die Hefe mit Kreosotwasser digerirten, also die Hefe abtödteten, dabei aber eine reichliche Spaltung der in der Hefe befindlichen Eiweisskörper erhielten.

war zur Genüge das Vorhandensein eines proteolytischen Enzyms in der Hefe dargethan. Nur die Frage nach der Natur desselben blieb noch offen, dieselbe konnte von den bisherigen Untersuchern nicht festgestellt werden, weil dieselben charakteristische Spaltungsprodukte, die das Enzym aus dem Eiweiss erzeugte, nicht in Händen hatten. Erst mir ist es, Dank der von Kossel ausgearbeiteten Methoden, gelungen, solche in den Hexonbasen darzustellen.

Ich will jedoch, bevor ich den Schluss ziehe, dass in der Hefe ein dem Trypsin der Warmblüter analoges oder sehr ähnliches Enzym vorhanden ist, etwas näher auf die Natur und Wirkungsweise des proteolytischen Enzyms des Pankreas, das wir Trypsin nennen, eingehen. Rasch und leicht würde es uns möglich sein, ein Enzym als Trypsin zu identificiren, wenn wir über Methoden verfügten, die gestatteten, das Trypsin in absoluter Reinheit zu isoliren. Dann würde uns die Elementaranalyse die weitere Identificirung ohne Mühe gestatten. Ueber die Methoden, die man zur Reindarstellung des Trypsins ausgearbeitet hat, und die Körper, welche man mit ihrer Hülfe als Trypsin isolirt hat, kann ich hier wohl hinweggehen, sie haben Produkte, die einer strengen wissenschaftlichen Prüfung standhalten würden, nicht geliefert.

Wir sind daher nach wie vor darauf angewiesen, zur Identificirung des Trypsins auf seine Wirkungsweise zurückzugreifen. Nun haben unsere Ansichten über die Wirkungsweise des Trypsins recht tiefgehende Wandlungen erfahren. Corvisart und Claude Bernard, die ersten, die die Wirkungsweise des Trypsins näher studirten, ertheilten demselben kaum eine andere Rolle als dem proteolytischen Enzym des Magensaftes, dem Pepsin. Nach ihnen wurden durch das Trypsin die unlöslichen Eiweisskörper der Nahrung verflüssigt und in diffusible Form gebracht, damit endete für sie die Wirkung des Trypsins auf das Eiweiss.

Durch Kühne wurden unsere Kenntnisse über das Trypsin wesentlich erweitert. Wir erfuhren durch ihn, dass

durch das Trypsin die Spaltung der Eiweisskörper viel weiter geht, als Corvisart und Claude Bernard annahmen. Denn in einwandfreien, die Fäulniss ausschliessenden Versuchen bewies er, wie die Eiweisskörper unter der Einwirkung des Trypsins bis zur Bildung von Leucin und Tyrosin gespalten werden. Den grossen, nicht krystallisirbaren Rest, der nach der Abscheidung des Leucins und Tyrosins von den der Trypsinverdauung unterworfenen Eiweisskörpern verblieb, fasste Kühne als eine peptonartige Substanz auf, die aus einer besonders widerstandsfähigen Gruppe des Eiweissmoleküls der Antigruppe hervorgehen sollte. Kühne nannte deswegen jene Substanz Antipepton. Mit den Entdeckungen Kühne's waren charakteristische Spaltungsprodukte des Trypsins bekannt geworden und man bezeichnete damals mit Recht ein Enzym, unter dessen Einwirkung sich Leucin, Tyrosin und Antipepton aus den Eiweisskörpern abspalteten, als ein tryptisches. In letzter Zeit habe ich jedoch zeigen können, dass die Wirkungsweise des Trypsins eine andere ist, als sie Kühne angenommen hat. Denn die Voraussetzung von einer gegen Trypsin widerstandsfähigen Gruppe im Eiweissmolekül erwies sich als irrig und das Antipepton liess sich in verschiedene krystallisirbare Substanzen auflösen.

Quantitative Versuche ergaben, dass bei der tryptischen Verdauung die gleichen Spaltungsprodukte in der Menge aus dem Eiweiss hervorgehen, wie bei der Spaltung der Eiweisskörper durch siedende starke Schwefelsäure. Unseren erweiterten Kenntnissen über die Wirkungsweise des Trypsins müssen wir zur Zeit bei der Identificirung eines Enzyms Rechnung tragen. Wir können uns daher nicht mehr begnügen, Leucin und Tyrosin zu isoliren, um ein Enzym als tryptisches zu charakterisiren, sondern wir müssen auch wohl oder übel die übrigen Spaltungsprodukte, die erkennen lassen, dass die Spaltung der Eiweisskörper durch das untersuchte Enzym wie unter dem Einfluss siedender starker Schwefelsäure erfolgt, darstellen.

Nehmen wir diese schärfere Forderung zum Maassstab für die Identificirung des Trypsins, dann schrumpft das Ver-

breitungsgebiet des Trypsins wesentlich zusammen. So müssen wir z. B. den Bakterien, denen man bisher häufig das Vermögen, tryptisches Enzym zu produciren, zugesprochen hat, dieses absprechen. Wohl erzeugen die Bakterien Enzyme, die das Eiweiss unter Bildung von Leucin, Tyrosin, Ammoniak zu spalten vermögen, aber daneben treten dann meist Indol und Skatol auf, Körper, welche als besonders charakteristische Spaltungsprodukte aus dem Eiweiss, unter Einwirkung von schmelzendem Kali, gleichzeitig mit Ammoniak, Leucin und Tyrosin hervorgehen.

Danach scheint bei den Bakterien ein proteolytisches Enzym weit verbreitet zu sein, das das Eiweiss nach Art des schmelzenden Kalis zersetzt. Das Trypsin dagegen wirkt auf das Eiweiss wie eine starke siedende Säure ein. Unter den charakteristischen tryptischen Verdauungsprodukten tritt daher niemals Indol und Skatol, sondern die Hexonbasen, weiter Asparaginsäure und Glutaminsäure auf, und bis es nicht gelungen ist, die letztgenannten Spaltungsprodukte neben Ammoniak, Leucin, Tyrosin als Abbauprodukte des Eiweisses durch Bakterienenzyme nachzuweisen, müssen wir das Vorhandensein tryptischer Bakterienenzyme als mindestens zweifelhaft betrachten.

Es fragt sich nun, ob im Gegensatz zu den Bakterienenzymen das proteolytische Enzym der Hefe das Gleiche leistet, wie das thierische Trypsin. Diese Frage müssen wir unbedingt mit ja beantworten. Denn hier wie dort sehen wir unter der Wirkung des Enzyms das Eiweiss schnell zerfallen und eine Reihe Produkte liefern, wie sie aus dem Eiweiss bei Behandlung mit starker siedender Schwefelsäure hervorgehen; so lange uns also nur die Wirkungsweise der beiden Enzyme zur Identificirung bleibt, so lange müssen wir das proteolytische Enzym der Hefe als ein Trypsin betrachten, das dem thierischen ausserordentlich nahe steht.

Die physiologische Bedeutung der vorstehenden Beobachtungen, die erweisen, dass die einfache, frei lebende, pflanzliche Zelle ein proteolytisches Enzym bildet, welches dem Trypsin der Warmblüter identisch oder ausserordentlich nahe verwandt ist, ist klar.

Aber auch klinisch scheinen mir die erhaltenen Resultate einiges Interesse zu verdienen, denn sie geben die Möglichkeit, bei Erkrankungen des Pankreas, welche eine Störung in der Absonderung des tryptischen Enzyms bedingen, das Trypsin zu ersetzen, indem man den Kranken Hefe oder Hefepresssaft reicht.

Des Weiteren habe ich untersucht, ob unter normalen Verhältnissen, wie sie beim Brauprocess herrschen, an der Hefe Vorgänge, die zu einem Abbau stickstoffhaltiger Körperbestandtheile bis zu den vorher genannten krystallinischen Substanzen führen, sich beobachten lassen.

Es war mir nun schon aufgefallen, dass ich in den Extracten, die ich aus der frischen, wohl genährten Hefe durch Auskochen mit Wasser gewann, in den meisten Fällen nur Körper vom Charakter der Propeptone und Peptone nachweisen konnte, während ich höchst selten Tyrosin, Leucin, sowie die Hexonbasen in minimalen Mengen erhielt. Diese Versuche liessen bereits vermuthen, dass das Hefetrypsin in der gut genährten Hefe anders wirken müsse wie in der Hungerhefe. Die Untersuchung des Bieres, in das ja ebenso wie Alkohol und Kohlensäure auch die aus der Körpersubstanz der Hefe stammenden Abbauprodukte hineingehen müssen, bestätigten die an der gut genährten Hefe gewonnenen Resultate vollkommen. Denn es gelang mir in keinem Fall (ich untersuchte Lagerbier einer hiesigen Brauerei), im Bier die so charakteristischen stickstoffhaltigen Abbauprodukte der Hungerhefe nachzuweisen.

Wie erklären sich nun diese Befunde? Man könnte annehmen, dass in der gut genährten Hefe das Hefetrypsin nur als Zymogen, im Hungerzustande aber die wirksame Form erzeugt würde, das die Körpersubstanz der Hefe anzugreifen vermag. Dagegen sprechen jedoch die Beobachtungen, die man sonst an hungernden Organismen machen kann. Wir sehen bei ihnen im Gegentheil die Absonderung der proteolytischen Enzyme, mögen dieselben als Zymogen oder als wirksames Enzym abgesondert werden, zurückgehen oder ganz aufhören.

Mir scheint daher eine andere Voraussetzung, die Differenzen, welche man zwischen den Extractivstoffen der Hungerhefe und der gut genährten Hefe bemerkt, sowie das Fehlen



Danach wäre anzunehmen, dass sowohl die gut genannte Hefe wie die Hungerhefe das freie Enzym erzeugen. Bei der unter günstigen Bedingungen befindlichen Hefe wirkt das Enzym jedoch auf die in das Innere der Zelle diffundierten, von den proteolytischen Enzymen des Malzes bereits vorbereiteten stickstoffhaltigen Nährstoffe und verändert dieselben so weit, dass sie die Hefe zum Aufbau ihrer Leibessubstanz verwerthen kann. Das Enzym wirkt hier also, um mich kurz auszudrücken, als **construierendes Enzym**. Bei der Hungerhefe dagegen, bei der todte stickstoffhaltige Nährstoffe nicht vorhanden sind, greift das Enzym schliesslich auch die lebende Zellsubstanz an und zerstört dieselbe, es wirkt also bei Hungerhefe als **destruierendes Enzym**.

#### Litteraturverzeichniss.

1. Thénard, Annales de chimie. T. 46.
2. Pasteur, Annales de chimie et phys. T. 58.
3. Schützenberger, Bulletin de la société chimique de Paris. T. 21, 1874. S. 194 u. 204; weiter Die Gährungserscheinungen 1876.
4. Kossel, Diese Zeitschrift Bd. III, S. 284, Bd. IV, S. 291, Bd. V, S. 251 u. 265.
5. Salkowski, Diese Zeitschrift Bd. XIII, S. 506; Zeitschr. f. klin. Medecin Bd. 17, Suppl.; Centralbl. f. d. med. Wissenschaft 1889, Nr. 13.
6. Hahn, Berichte d. deutsch. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 31 I, 200, Geret u. Hahn; Ber. d. deutsch. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 31 I, 202, Geret u. Hahn; Ber. d. deutsch. chemisch. Gesellsch. Jahrg. 31 II, 2335.
7. Krüger u. Salomon, Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 350.
8. Victor Lehman, Diese Zeitschrift Bd. IX, S. 563.
9. Kutscher, Die Endprodukte der Trypsinverdauung; Sitzungsberichte der Gesellschaft zur Beförderung der ges. Naturwissenschaften Juni 1900 u. November 1900.
10. Corvisart, Sur une fonction peu connue du Pancréas. Paris 1857—1858.
11. Claude Bernard, Mémoire sur le Pancréas et sur le rôle du suc pancréatique. Paris 1856.
12. Kühne, Verhandl. des naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg. N. F. Bd. 1, Jahrg. 1877, S. 190 u. 236; Zeitschrift f. Biologie Bd. 19, S. 164.
13. Fr. Weiss, Diese Zeitschrift Bd. XXXI, S. 79. W. bespricht auch kurz die früheren Arbeiten über die proteolytischen Enzyme des Malzes, so die von Windisch und Schellhorn.

## **Eine Bemerkung zu der Abhandlung Kossel's und Kutscher's über die Eiweisskörper.**

Von  
**Ivar Bang.**

---

(Der Redaction zugegangen am 27. December 1900.)

---

In einer Abhandlung: «Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper» <sup>1)</sup> haben Kossel und Kutscher auch die Histone besprochen.

Hier hat Kossel sich und seinem Schüler Mathews die Entdeckung der zwei wichtigen Histonreactionen: Fällbarkeit bei neutraler oder schwach alkalischer Reaction der Histone durch die Alkaloidreagentien und Fällbarkeit der Eiweisskörper durch die Histone zugeschrieben, während nach meiner Ansicht ich <sup>2)</sup> zum ersten Male diese Reactionen für die Histone aufgestellt habe.

Weder Kossel noch Mathews haben nämlich diese Reactionen für die Histone nachgewiesen. Kossel verweist zwar auf die Abhandlung dieser Zeitschrift Bd. XXV, S. 168. Hier steht aber nichts über die Histone. Man findet nur, dass die Clupeinsalze von den Alkaloidreagentien niedergeschlagen werden und weiter, dass Clupein Eiweiss fällt. Und Clupein ist doch kein Histon. Mathews hat gefunden, <sup>3)</sup> dass das Arbacin von den neutralen Alkaloidreagentien niedergeschlagen wird und weiter, dass es Eiweiss fällt. Das Arbacin gab weiter die Biuretreaction und Millon's Reaction und wurde von Ammoniak allerdings unvollständig niedergeschlagen. Das Arbacin, sagt weiter Mathews, besitzt demnach alle die fällenden Eigenschaften<sup>4)</sup> des Protamins (d. h. also die zwei

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, H. 1—2.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 474ff.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 402.

<sup>4)</sup> Von mir cursivirt.

ersten Reactionen [B]) und zugleich die Reactionen des Histons (d. h. die Ammoniakreaction, Millon's Reaction [B]).

Mathews sagt also nicht, dass das Histon die zwei neuen Reactionen gibt, im Gegentheil hat er ausdrücklicher vorgehoben, dass diese Reactionen Protaminreactionen sind und nicht dem Histon gehörten.

Wenn man diese Thatsachen mit den folgenden Aeusserungen Kossel's und Kutscher's zusammenhält: «später hat Bang diese Reactionen bei den Histonen noch einmal<sup>1)</sup> hervorgehoben (also nachdem Kossel und Mathews [wie oben herausgestellt!] dies gefunden haben sollen), wird die Argumentation dieser Herren für einen jeden einleuchtend.<sup>2)</sup> Ich brauche dieselbe deshalb nicht näher zu charakterisiren.

Uebrigens werde ich zufügen, dass die Ammoniakreaction, welche Kossel als ein «charakteristisches Merkmal» des Histons anführt, ziemlich werthlos ist, wie ich in derselben Abhandlung bewiesen habe. Ist Herr Professor Kossel nicht damit zufrieden, muss er seine Auffassung erst beweisen.

---

1) Von mir cursivirt.

2) In der letzten Ausgabe der Harnanalyse hat Huppert zwar Kossel die Enddeckung der zwei neuen Histonreactionen zugeschrieben. Dieser Irrthum Huppert's beweist jedoch nichts. Ich kann auch darauf verweisen, dass z. B. Cohnheim in seiner Monographie der Eiweisskörper mir die neuen Histonreactionen zuschreibt, ebenso wie er meiner Auffassung des ganzen Histonbegriffes folgt.

Im 25. Bande dieser Zeitschrift (S. 168) habe ich mitgetheilt, dass die von mir als basische einfache Eiweisskörper charakterisirten Protamine mit denjenigen Fällungsmitteln, welche andere Eiweisskörper nur in sauren Lösungen fällen, schon in neutralen Lösungen einen Niederschlag geben. Es dürfte wohl für jeden Chemiker selbstverständlich sein, dass diese Eigenthümlichkeit durch den basischen Charakter des Moleküls bedingt ist.

Herr Bang nimmt nun in der vorhergehenden «Bemerkung» den Ruhm für sich in Anspruch, mir bei der Uebertragung meiner Reaction von den einfacheren basischen Eiweissstoffen, den Protaminen, auf die complicirteren basischen Eiweissstoffe, die Histone, zugekommen zu sein. Ich kann dem Herrn Bang aber dieses Verdienst nicht zugestehen, da Herr Mathews in meinem Laboratorium dieselbe Reaction auch bereits auf ein Histon, nämlich das Arbacin, angewandt und dies veröffentlicht hatte, ehe die Arbeit des Herrn Bang über das Histon erschien.<sup>1)</sup> Ebenso hat Mathews hervorgehoben, dass dies Histon eiweissfällende Eigenschaften besitzt. An dieser Thatsache ändert auch die Deutung, die Herr Bang den Worten des Herrn Mathews zu geben sucht, gar nichts. Völlig aus der Luft gegriffen ist die Behauptung des Herrn Bang, Herr Mathews habe ausdrücklich hervorgehoben, dass diese Reactionen nicht dem Histon zugehören.

Herr Bang hält es ferner für angemessen, zu behaupten, dass die von mir angegebene Ammoniakreaction des Histons «ziemlich werthlos» sei. Der «Werth» einer Reaction zeigt sich darin, dass sie mit Erfolg angewandt werden kann. Ich habe mit Hülfe der Ammoniakreaction das Histon überhaupt aufgefunden und die Histongruppe als eine eigenartige Eiweissgruppe erkannt.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 402.

# Ueber die Bestimmung des Harnindicans als Indigoroth mittelst Isatinsalzsäure.

Von

Jac. Bouma.

---

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität in Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 22. December 1900.)

---

Wie ich früher auseinandergesetzt habe,<sup>1)</sup> glaube ich annehmen zu dürfen, dass bei der Oxydation des Indoxyls im Harn mittelst Ferrichloridsalzsäure, neben dem Indigoblau, in wechselnder Menge auch Indigoroth und Indigobraun gebildet wird; demzufolge ist man verpflichtet, bei der Harnindicanbestimmung mittelst Obermayer's Reagens die drei Formen des Indigos sämmtlich in Betracht zu nehmen.

Beim Suchen nach einem Mittel, um alles Indoxyl des Harns in eine einzelne Form von Indigo umzusetzen, wurde mir der Weg gezeigt durch eine Bemerkung von Prof. Beyerink, welcher eine Lösung von Isatin in Salzsäure angewendet hat, um Indican in Pflanzenzellen nachzuweisen, und dabei bemerkte, dass auch das Indoxyl des Harns viel besser mittelst Isatin als Indigoroth als in der Form von Indigoblau nachgewiesen werden kann.<sup>2)</sup>

Wirklich wird beim Kochen frischen Harns mit Salzsäure und Isatin alles Indoxyl des Harns in Indigoroth umgewandelt.

Diese Reaction hat zwei Vortheile: erstens wird nur ein Farbstoff gebildet, während bei der Bildung von Indigo durch

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift Bd. XXX., S. 117.

<sup>2)</sup> Versl. Kon. Akad. v. Wetensch., Amsterdam, 31. März 1900, S. 579.

Oxydation von Indoxyl die Farbe des in Chloroform löslichen Stoffes in verschiedenen Fällen sehr wechselnd ist (einmal mehr blau, dann wieder mehr roth, bisweilen auch, zufolge der Anwesenheit von viel Indigobraun, nicht leicht mit einem Namen zu bezeichnen); zweitens ist das Quantum des gebildeten Indigo doppelt so gross als bei der Oxydation des Indoxyls. Im ersten Falle liefert jedes Molekül Indoxyl, indem es sich mit einem Molekül Isatin, unter Austritt von einem Molekül Wasser, verbindet, ein Molekül Indigo, während bei den Methoden von Jaffé und von Obermayer für die Bildung jedes Moleküls Indigo zwei Moleküle Indoxyl nöthig sind. Demzufolge wird die Empfindlichkeit der Reaction durch Behandlung des Harns mit Isatin verdoppelt.

Ich habe nun diese Reaction benutzt, um den Gehalt des Harns an Indican zu bestimmen.

In erster Reihe musste untersucht werden, wie stark die Lösung von Isatin in Salzsäure sein muss, um das Reagens praktisch verwendbar zu machen. Man muss dabei mit folgenden Factoren rechnen: erstens muss alles Indoxyl in Indigo umgebildet werden; es muss also genügend Isatin in der Lösung vorhanden sein; zweitens muss man nicht zuviel Isatin gebrauchen, da der Ueberschuss, der nicht an Indoxyl gebunden worden ist, aus dem Chloroformresiduum mittelst Wasser extrahirt werden muss. Nach den zahlreichen Bestimmungen von Harnindican, welche von mir gemacht wurden, fand ich, dass eine Lösung von 20 mg. Isatin in 1 Liter concentrirter Salzsäure ein passendes Reagens ist. Für die Indicanbestimmung von sehr reichhaltigen Harnen thut man besser, das Filtrat des mit Bleiessig gefällten Harns mit Wasser zu verdünnen, wodurch obendrein verhütet wird, dass Indigo-roth sich krystallinisch im Scheidetrichter absetzt.

Den ungefähren Gehalt an Indican des Harns kann man vorher mittelst Isatinsalzsäure colorimetrisch bestimmen. Man kocht dazu gleiche Volumina Harn und Reagens und schüttelt danach aus mit Chloroform. Beim Gebrauch von 5 ccm. Harn mit 5 ccm. Reagens und 2 ccm. Chloroform färbt sich letzteres bei indicanarmem Harn leicht rosaroth, bei leichter Indican-

trats mit Wasser geboten. Dieses Verfahren eignet sich sehr gut zur klinischen Bestimmung des Harnindicans; auf diese klinisch-colorimetrische Methode komme ich unten ausführlicher zurück.

Die titrimetrische Bestimmung des Harnindicans wird folgender Weise vorgenommen. Der Harn wird mit Bleiessig (1 Volumen auf 10 Volumen Harn) gefällt, das klare Filtrat mit dem gleichen Volumen Isatinsalzsäure versetzt und eine Viertelstunde auf dem kochenden Wasserbade erhitzt; das Gemisch färbt sich dabei gewöhnlich dunkelroth. Nach dieser Bearbeitung wird die Flüssigkeit abgekühlt und in dem Scheidetrichter mit Chloroform ausgeschüttelt. Man lässt nun das Chloroformextract einige Minuten ruhig stehen, damit sich die Tröpfchen mechanisch mitgeführten Harns an der Schaaale absetzen; danach wird die Lösung vorsichtig abgegossen, das Chloroform verdunstet und der Rückstand zwei Stunden bei  $110^{\circ}$  C. getrocknet. Nach dieser Behandlung muss der Rückstand vom überflüssigen Isatin befreit werden, denn das in der Salzsäurelösung befindliche Isatin wird nicht ganz verbraucht; der Ueberschuss geht in das Chloroformextract über und bleibt nach Verdunsten des Chloroforms im Residuum zurück. Da nun das Isatin beim Erhitzen des Rückstandes auf  $110^{\circ}$  C. nicht verflüchtigt, muss man den Chloroformrückstand mit heissem Wasser, worin das Isatin leicht löslich ist, ausziehen, bis die abgegossene Flüssigkeit nicht mehr reducirt. Diese Entfernung des Isatins ist nothwendig, da dasselbe als Isatinschwefelsäure bei der Titration, zugleich mit der Indigoschwefelsäure, Chamäleon verbraucht.

Nach den erwähnten Reinigungen wird das trockene Residuum mit Schwefelsäure versetzt und als Indigorothdisulfosäure mit Chamäleon titirt.

Bezüglich der Titration des Indigoroths muss ich bemerken, dass, während bei der Titration des Indigoblaus als Disulfosäure eine Verdünnung von mindestens 1 auf 20000 geboten ist, man bei der Titration des Indigoroths diesen Ver-

dünnungsgrad nicht überschreiten darf, da man sonst zu viel Chamäleon verbraucht. Die Titirflüssigkeiten müssen ganz klar sein; bei leichter Trübung ist der Farbenwechsel undeutlich. Ist also eine Filtrirung nothwendig, dann misst man vorher die ganze Menge der wässerigen Indigodisulfosäurelösung und filtrirt durch ein trockenes Filtrum, wonach man einen abgemessenen Theil des Filtrats titirt. Hierbei ist jedoch eine Fehlerquelle zu erwähnen. Das zuerst durchgelaufene Filtrat enthält einen geringeren Procentgehalt an Indigo als die ganze Lösung; nicht nur sättigt sich das trockene Filtrum mit der Lösung, es wird zugleich auch Indigo der Lösung entzogen und im Filtrum festgelegt. Es ist daher nothwendig, dass man ein kleines Filtrum benutzt und die zuerst durchgelaufenen 20—30 ccm. Filtrat unbenutzt lässt.

Bisweilen kommt es vor, dass sich gegen Ende der Titration äusserst fein vertheiltes Mangandioxyd in der Flüssigkeit abscheidet, wodurch Störung von zweierlei Art entsteht. Erstens wird der Sauerstoff des Kaliumpermanganats nicht in genügendem Maasse für die Oxydation des Indigos verbraucht; zweitens bekommt die Flüssigkeit eine braune Nüance, wodurch die genaue Bestimmung des Augenblicks, in welchem alles Indigoroth verschwunden ist, behindert wird. Dieser Uebelstand ist zu beseitigen, wenn man dann und wann während der Titration ein wenig starke Schwefelsäure zu der Flüssigkeit hinzufügt.

Selbstverständlich bekommt man auf diese Weise ein Quantum Indigo, doppelt so gross als dasjenige, welches das oxydirte Harnindoxyl geliefert haben würde, denn die eine Hälfte des Indigomoleküls wird vom Harnindican und die andere Hälfte vom Isatin geliefert.

Falls nun die Bestimmung des Harnindicans nach Wang (d. h. die Titirung des reinen Indigoblaus nach Waschung des Chloroformrückstandes mit Aetheralkoholwasser, wobei die rothbraunen Farbstoffe als Verunreinigungen aufgefasst und entfernt werden) die richtige Methode ist, dann muss der Ertrag an Indigoblau gleich der Hälfte des Ertrags an Indigoroth sein. Sind dagegen die von mir isolirten und als Indigo-



wirklich Indigo, dann muss der Ertrag der gesamten Farbstoffe gleich der Hälfte des mittelst Isatinsalzsäure erhaltenen Indigoroths sein. Zur Beantwortung dieser Frage habe ich vergleichende Bestimmungen gemacht von gleichen Mengen desselben Filtrats von mit Bleiessig gefälltem Harn, nach den folgenden drei verschiedenen Methoden behandelt:

a) Nach der ursprünglichen Methode Wang-Obermayer mit Ferrichloridsalzsäure, Oxydation während einer Stunde bei Zimmertemperatur und Erhitzen des Chloroformresiduums auf  $110^{\circ}$  während zweier Stunden.

b) Nach der Methode Wang mit Waschung des Chloroformresiduums mit Aetheralkoholwasser.

c) Nach der oben erwähnten Methode mit Isatinsalzsäure.

Die erhaltenen Farbstoffe wurden mit derselben Chamäleonlösung titriert; für jede Bestimmung wurden 440 ccm. Filtrat entsprechend 400 ccm. Harn verarbeitet.

Die Ergebnisse von 8 Versuchsreihen sind folgende:

I.

- a) 3,56 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,13 „ Indigoblau,
- c) 7,76 „ Indigoroth.

II.

- a) 4,90 mg Indigofarbstoffe,
- b) 2,55 „ Indigoblau,
- c) 10,38 „ Indigoroth.

III.

- a) 3,19 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,53 „ Indigoblau,
- c) 7,01 „ Indigoroth.

IV.

- a) 3,45 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,39 „ Indigoblau,
- c) 8,00 „ Indigoroth.

V.

- a) 3,50 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,47 „ Indigoblau,
- c) 7,80 „ Indigoroth.

- a) 3,27 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,86 » Indigoblau,
- c) 7,51 » Indigorothe.

#### VII.

- a) 3,94 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,92 » Indigoblau,
- c) 8,72 » Indigorothe.

#### VIII.

- a) 2,25 mg Indigofarbstoffe,
- b) 1,66 » Indigoblau,
- b) 5,19 » Indigorothe.

Aus all diesen Versuchen geht hervor, dass der Ertrag an Indigoblau in keinem festen Verhältniss zum Ertrag an Indigorothe steht und viel weniger als die Hälfte beträgt. In dessen bleibt der Ertrag der gesammten Indigofarbstoffe etwas unter der Hälfte des Ertrags an Indigorothe, während letzterer gerade das Doppelte von ersterem sein müsste.

Beim Untersuchen der Ursache dieser Thatsache kommt in erster Reihe die Frage in Betracht, ob das Produkt, womit wir zu thun haben, reines Indigorothe ist oder nicht.

Zur Beantwortung dieser Frage habe ich die reducirende Kraft von Harnindigorothe verglichen mit der von Indigorothe von Bayer und von Indigorothe, das ich durch Sublimation im Vacuum daraus erhalten habe. In zweiter Reihe habe ich zu diesem Zwecke neben dem Harnindigorothe synthetisches Indigorothe von der Badischen Anilin- und Sodafabrik und sublimirtes Indigorothe von Bayer gewählt. Selbstverständlich wurden jedesmal die drei beisammen gehörigen Bestimmungen mit derselben Chamäleonlösung gemacht.

#### I.

5,2 mg subl. Indigorothe verbr. 18,8 ccm. Cham.  
 15,6 » Indigorothe Bayer verbr. 57,4 ccm. Cham. ( $5,2 : 15,6 = 18,8 : 56,4$ ),  
 18,5 » Harnindigorothe » 64,5 » » ( $5,2 : 18,5 = 18,8 : 66,9$ ).

Bei diesem Versuche hat also das Indigorothe von Bayer etwas mehr und das Harnindigorothe etwas weniger Chamäleon verbraucht als das sublimirte Indigorothe.

## II.

5,4 mg synth. Indigoroth verbr. 24,5 ccm. Cham.  
 6,0 „ subl. Indigoroth Bayer verbr. 26,8 ccm. Cham. (5,4 : 6 = 24,5 : 27,2),  
 13,1 „ Harnindigoroth „ 56,7 „ „ (5,4 : 13,1 = 24,5 : 59,4).

Aus dieser zweiten Versuchsreihe geht hervor, dass das synthetische Indigoroth am meisten Chamäleon verbraucht hat; danach folgen sublimirtes Indigoroth von Bayer und Harnindigoroth.

Obige Zahlen zeigen unzweideutig, dass wir das mittelst Isatinsalzsäure aus Harn auf erwähntem Wege erhaltene Indigoroth als ein ziemlich reines Produkt anerkennen müssen. In zweiter Reihe kommt die Frage in Betracht, ob sich im mit Bleiessig gefällten Harn reducirende Bestandtheile befinden, welche Isatin zu Indigo umbilden können. Solche Stoffe sind Glucose, Isomaltose, Kreatinin, unter Umständen auch Lactose und Pentose. Was die Zuckerarten anbetrifft, so sind diese bei saurer Reaction nicht im Stande, Isatin zu reduciren und ebensowenig das Kreatinin; von der Richtigkeit dieser Annahmen habe ich mich überzeugt.

Dass der Harn des Menschen ausser den Stoffen, welche sich zufolge den Fäulnissprocessen im Darne darin befinden, keine Bestandtheile enthält, welche bei der Behandlung mit Isatinsalzsäure roth gefärbte, in Chloroform lösliche Stoffe entstehen lassen, ergibt sich aus der Untersuchung des Harnes von Neugeborenen, wozu Herr Professor Kouwer so freundlich war, mir die Gelegenheit zu bieten. In Uebereinstimmung mit demjenigen, was Senator schon vor vielen Jahren darüber mitgetheilt hat,<sup>1)</sup> fand ich in dem ersten Urinquantum, welches nach der Geburt entleert wurde, keine Spur von Indoxyl. Das Chloroform, womit der Harn nach Kochen mit Isatinsalzsäure geschüttelt wurde, nahm Isatin auf und färbte sich demzufolge etwas gelblich; jedoch von einer rothen Nüance zeigte es nicht die allergeringste Spur. Beim Fehlen von Indoxyl enthielt also der Harn keinen anderen Stoff, welcher mit Isatin Indigoroth bilden konnte. Einmal erhielt ich schon aus Harn,

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 3.

welcher am zweiten Tage nach der Geburt entleert war, ein wohl sehr schwach, aber doch deutlich roth gefärbtes Chloroformextract. Die Menge des Indoxyls war aber so gering, dass dieselbe mit dem Reagens von Obermayer nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Thatsache, dass der Ertrag an Indigoroth etwas grösser ist als das Doppelte der gesammten Indigofarbstoffe bei der Behandlung mit Ferrichloridsalzsäure, muss daher wahrscheinlich erklärt werden durch eine vollständigere Umbildung des Harnindoxyls in Indigo bei der Behandlung mit Isatinsalzsäure.

Bevor ich die Besprechung der titrimetrischen Bestimmung des Harnindigoroths beende, muss ich noch Folgendes bemerken:

Es wird jeder, der sich mit Indigobestimmungen beschäftigt hat, erfahren haben, dass Bestimmungen von Indigo mittelst Titration mit Chamäleon, welche auf Oxalsäure gestellt ist, nicht immer den theoretischen Verhältnissen entsprechen. Diese Thatsache muss schon Mohr nicht entgangen sein, da er diesbezüglich anführt:<sup>1)</sup> «Um eine solche Bestimmung auf absolutes Maass zurückzuführen, hat man die Beziehung der Chamäleonlösung auf reines Indigotin festzustellen.» Vielleicht ist es zweckmässig, hier auch zu erwähnen, was die Badische Anilin- und Sodafabrik in dieser Beziehung anführt:<sup>2)</sup> «Versuche haben indessen gezeigt, dass diese Berechnungen, wenn sie auch theoretisch vollkommen richtig sind, den thatsächlichen Verhältnissen nicht immer entsprechen und Irrthümer verursachen können. Die Oxydation verläuft augenscheinlich nicht unter allen Umständen quantitativ nach der angeführten Gleichung. Es ist das einzig Richtige, die Beziehung auf Oxalsäure ganz fallen zu lassen und das Chamäleon auf chemisch reines Indigo einzustellen, das Indigo also mit sich selber zu messen.»

Durch diese Mittheilungen und durch eigene Erfahrung

---

1) Lehrb. d. chem.-anal. titr. Meth. 1886, S. 800.

2) Ueber Indigorein. B. A. u. S. F. 1899, S. 15 u. 16.

des Indigo meine Chamäleonlösungen auf das chemisch reine synthetische Produkt der Badischen Anilin- und Sodafabrik gestellt.

Alle Arten von Indigoroth, welche ich aus verschiedenen Bezugsquellen erhielt, enthalten mehr oder weniger andere Indigomodificationen. So konnte ich aus dem Indigoroth von Bayer, nach Lösung in Chloroform und Verdunsten desselben, das reine Roth mittelst Aether von dem Residuum abspülen; der Belag zeigte jetzt die Farbe des Indigobrauns, welches sich in Alkohol löste, wonach etwas Indigoblau auf der Schaaale zurückblieb. Auch das synthetische Indigoroth von der Badischen Anilin- und Sodafabrik enthält etwas Blau, sodass ich mir das reine synthetische Roth verschaffte durch Abspülen des Chloroformrückstandes mit Aether.

Ich muss jetzt noch zurückkommen auf die colorimetrische Bestimmung des Harnindicans als Indigoroth für die klinische Untersuchung. Eine klinische Bestimmungsmethode muss, um praktisch verwendbar zu sein, einfach, bequem und schnell ausführbar sein, bei möglichst grosser Genauigkeit. Zu diesem Zwecke habe ich einen Indicanurometer zusammengestellt, welcher aus 11 in einer Reihe geordneten Reagensröhrchen von gleichem Durchmesser und gleicher Wanddicke besteht. Sechs dieser Röhrchen enthalten eine Lösung von aus Harn bereitetem Indigoroth in Chloroform von verschiedener Stärke, welche der Reihe nach übereinstimmt mit einem Gehalt des Harns an Indigo von 5, 10, 15, 20, 30, 40 mg per Liter.

Diese Röhrchen sind auf folgende Weise angefertigt:

Indigoroth, nach oben erwähnter Methode so rein wie möglich aus Harn bereitet, wurde in Chloroform gelöst. Von einem Theil dieser Lösung wurde das Chloroform verdunstet und der Gehalt an Indigo bestimmt mittelst Titration mit Chamäleon, welche auf reines synthetisches Indigoroth gestellt war. Vom anderen Theil der Lösung des Indigoroths wurden durch geeignete Verdünnung Flüssigkeiten bereitet, welche der Reihe nach 10, 20, 30, 40, 60 und 80 mg Indigo enthielten auf 1 Liter Chloroform. Diese Flüssigkeiten wurden als

Standardlösungen gebraucht, mit deren Hilfe auf colorimetrischem Wege eine beliebige Anzahl Röhrchen mit Indigoroth in Chloroform von bekannter Stärke angefertigt werden konnten. Diese Röhrchen wurden danach zugeschmolzen und konnten jetzt gebraucht werden, um durch Vergleichung der Farbe die Quantität Indigo zu bestimmen in Chloroform, womit der zu untersuchende Harn, nach dem kochen mit Isatinsalzsäure ausgeschüttelt war.

Im Apparat ist zwischen je zwei Standardröhrchen Raum offen gelassen für das Hinstellen eines Proberöhrchens, um die Farbenvergleichung zu erleichtern.

Wenn nun bei jedem Versuch das Volumen des Chloroforms, worin das Indigoroth gelöst wird, gleich gross genommen wird, wie das Volumen des für den Versuch gebrauchten Harns, so kann sofort aus der Intensität der Farbe des Chloroforms der Gehalt des Harns an Indican bestimmt werden, wobei jedoch zu bemerken ist, dass das vom Indoxyl herrührende Indigo die Hälfte beträgt des im Chloroform aufgenommenen Quantums. Ein Chloroformextract von gleicher Farbenintensität als ein Standardröhrchen, welches Chloroform enthält, mit 10 mg Indigoroth per Liter bedeutet also, dass der untersuchte Harn soviel Indican enthält, als 5 mg Indigo entspricht. Ein solcher Harn liefert ja doch mit Isatin 10 mg Indigo.

Zur Erleichterung der Untersuchung ist auf dem Standardröhrchen nicht der wirkliche Gehalt an Indigo, sondern die Hälfte davon angegeben. Man liest also auf dem Standardröhrchen, welches mit dem untersuchten am meisten in Farbe übereinstimmt, unmittelbar die Quantität Indigo ab, welche dem Quantum Indican in 1 Liter des untersuchten Harns entspricht.

Die Bestimmung wird nun auf folgende Weise ausgeführt. Ein gewisses Quantum des zu untersuchenden Harns (z. B. 20 ccm.) wird mit  $\frac{1}{10}$  seines Volumens an Bleiessig gefällt und durch ein trockenes Filtrum filtrirt. Vom klaren Filtrat giesst man  $5\frac{1}{2}$  ccm. (entsprechend 5 ccm. Harn) in ein Proberöhrchen und fügt eine Lösung von 20 mg Isatin auf 1 Liter starke Salzsäure hinzu. Wenn der Harn nicht

ist ein Quantum von 5 ccm. Reagens ausreichend. Da jedoch ein Uebermass von Salzsäure und von Isatin hier nicht schadet, ist es besser, zur Vermeidung der Gefahr, dass ein grösserer Indoxylgehalt sich der Beobachtung entzieht, zu  $5\frac{1}{2}$  ccm. Filtrat 10 ccm. Isatinsalzsäure zu fügen. Wenn das Quantum des erhaltenen Indigos ausserordentlich gross ist, kann man immer noch den Versuch mit dem Filtrat, nach Verdünnung mit einer gemessenen Quantität Wasser, wiederholen. Man erhitzt nun die Mischung von Filtrat und Reagens bis zur Siedehitze und kocht noch einige Secunden, wonach man das Röhrchen abkühlt und den Inhalt tüchtig ausschüttelt mit 5 ccm. Chloroform. Das gebildete Indigoroth wird vom Chloroform aufgenommen und es ist, wenn man das Proberöhrchen in die Reihe der Standardröhrchen hinstellt, nicht schwer zu bestimmen, mit welchem davon es in Farbenintensität am meisten übereinstimmt.

Einige Male habe ich die auf diese Weise gemachte colorimetrische Bestimmung kontrollirt durch Titration des aus 300 oder 400 ccm. desselben Harns bereiteten Indigoroth.

Die Ergebnisse waren:

Colorimetrisch:	Titrimetrisch:
I. Zwischen 5 und 10 mg	7,6 mg
II. „ 30 „ 40 „	33,0 „
III. Etwas über 30 mg	32,5 „

Auf den Proberöhrchen sind im Interesse der Zeitersparniss Theilstriche angebracht bei  $5\frac{1}{2}$ ,  $15\frac{1}{2}$  und  $20\frac{1}{2}$  ccm., übereinstimmend mit den nacheinander anzuwendenden Flüssigkeitsmengen. Lässt man das Filtrat des mit Bleiessig gefällten Harns sofort in ein Proberöhrchen laufen und führt man die weitere Behandlung so, wie ich erwähnt habe, aus, dann nimmt diese Bestimmung nur einige Minuten in Anspruch. Das Füllen des Harns mit Bleiessig, welches von so grosser Wichtigkeit ist bei der titrimetrischen Bestimmung für die Entfernung von störenden und reducirenden Stoffen, ist auch für diese colorimetrische Methode sehr zu empfehlen, da man hierdurch die Bildung eines Magmas beim Ausschütteln mit Chloroform ver-

hütet und das klare Chloroformextract sofort colorimetrisch beurtheilen kann.

Verdünnung des Filtrats mit Wasser ist bei sehr starker Indicanurie zu empfehlen, um zu verhüten, dass sich krystalinisches Indigorothe absetzt, das nicht leicht in das Chloroform übergeht.

Für die Bereitung meiner Isatinsalzsäurelösung habe ich Isatin von Merck benutzt; die Salzsäure muss chemisch rein sein, da bei geringer Verunreinigung mit Eisen die rothe Reaction sich mit der Reaction von Stokvis mischt und das Chloroform eine violette Farbe annimmt.

Das Isatinsalzsäurereagens muss jeden Monat frisch bereitet werden.

Endlich muss ich noch darauf aufmerksam machen, dass Harn, der nicht frisch ist, bei der Behandlung mit Isatinsalzsäure neben Indigorothe etwas Blau liefern kann. Dasselbe habe ich bei dem frisch entleerten Harn eines Patienten, der an Cystitis litt, beobachtet. In diesem Falle reagirte der Harn in Folge der Wirkung von Bakterien alkalisch.

Es ist nöthig, zum Erhalten der richtigen Farbe, die Standardröhrchen im Dunkeln aufzubewahren.

---



# Ueber den Nachweis von Cystin und Cystein unter den Spaltungsprodukten der Eiweisskörper.

Von

Gustav Embden,

zweitem Assistenten am physiologischen Institut der Universität Zürich.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 43).

(Der Redaction zugegangen am 25. December 1900.)

Dass Cystin als Spaltungsprodukt von Eiweisskörpern auftritt, war schon durch ältere gelegentliche Befunde von R. Külz<sup>1)</sup> und Emmerling<sup>2)</sup> nahe gelegt worden, doch waren die Bemühungen, es durch Darstellung und Analyse sicher nachzuweisen, vergeblich gewesen, bis es vor etwas mehr als Jahresfrist K. A. H. Mörner<sup>3)</sup> in einer wichtigen Untersuchung gelang, die reichliche Bildung von Cystin bei Hydrolyse von Keratin ausser Frage zu stellen.

Ohne Kenntniss von dieser Untersuchung zu haben, gelangte ich kurze Zeit nach deren Erscheinen auf wesentlich abweichendem Wege zum gleichen Resultat und bei Fortführung der Versuche zu einigen, wie mir schien, beachtenswerthen Befunden.

In einem Vortrag auf dem diesjährigen internationalen Congress in Paris hat Mörner seine früheren Angaben vervollständigt und dabei eine Reihe werthvoller neuer That-sachen mitgetheilt.

Da der Vortrag wenig bekannt geworden ist, hat mir Herr Professor Mörner gestattet, den wesentlichen Inhalt desselben, soweit er auf vorliegende Arbeit Bezug hat, auf Grund einer freundlichen brieflichen Mittheilung hier in Kürze anzuführen:

<sup>1)</sup> Zeitschrift für Biologie, Bd. 27, S. 415.

<sup>2)</sup> Chemikerzeitung 1894, S. 1539.

<sup>3)</sup> Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 595.

Mörner verbesserte und vereinfachte sein Verfahren der Cystindarstellung dadurch, dass er nach dem Zerlegen mit Salzsäure und nach Abdestilliren der Hauptmenge der Säure den Rückstand in schwachem Weingeist löste, mit Natronlauge oder Ammoniak (statt wie früher mit Bleioxyd) neutralisirte und den Niederschlag auf Cystin verarbeitete. Diese Darstellungsmethode benutzte er weiter zur approximativen Bestimmung des Cystins und neben gleichzeitiger Ermittlung des Gesamtschwefels und des bleischwärenden Schwefels zum Studium der Bindungsweise des Schwefels in den Keratinsubstanzen.

Er vermochte auf dem eingeschlagenen Wege reichlich Cystin ausser aus Horn auch aus der Schaalenhaut des Hühneries und aus Menschenhaaren rein zu gewinnen. Er beobachtete dabei, dass die Bildung von Cystin nicht nothwendig mit jener von Cystein einhergeht, und ist jetzt mehr noch, als aus seiner ersten Publication hervorging, geneigt, die Entstehung von Cystein als einen secundären Vorgang anzusehen.

Die approximativen Bestimmungen des Cystins, deren Ergebniss Mörner als eher zu niedrig, denn zu hoch ansieht, ergaben für Hornsubstanz 6,8%, für die Schaalenhaut des Eies 6,0%, für die Substanz aus Menschenhaaren 12,6% Cystin.

Mörner vermochte ferner auch aus echten Eiweissstoffen Cystin zu gewinnen. Aus dem Serumalbumin erhielt er etwas mehr als 1% eines in sechsseitigen Täfelchen krystallisirten Präparates, dessen Identität mit Cystin durch die Bestimmung des Schwefelgehalts ausser Zweifel gestellt wurde.<sup>1)</sup>

Meine einschlägigen, ohne Kenntniss dieser Befunde Mörner's gesammelten Erfahrungen haben ihnen gegenüber

---

1) Wie ich der brieflichen Mittheilung von Herrn Prof. Mörner entnehme, gelang es ihm seit dem auch, die Angabe von Külz über Bildung von Cystin bei tryptischer Verdauung unter Verwendung von käuflichem Bluteiweiss zu bestätigen. Zum gleichen Resultat ist übrigens auch Herr Dr. E. Petry im hiesigen Institute gelangt, bei Versuchen, welche das Schicksal der schwefelreichen Gruppe des Eiweissmoleküls im Verlauf der tryptischen Spaltung klarstellen sollten.

deren Mittheilung, zumal die von mir angewandte Methode mehrfach von jener Mörner's abwich, nicht ohne Nutzen sein.

### **Darstellung von Cystin aus Hornspänen.**

Zur raschen und bequemen Gewinnung von grösseren Mengen Cystin aus Hornspänen hat sich in zum Theil von mir allein, zum Theil gemeinsam mit Herrn Dr. V. Ducceschi ausgeführten Versuchen ein Verfahren bewährt, dessen wesentliche Operationen waren: Zersetzen der Hornspäne durch mehrstündiges Kochen mit concentrirter Salzsäure, Neutralisiren der Zersetzungsflüssigkeit mit Natronlauge, 24 stündiges Stehenlassen, dann Abfiltriren des abgeschiedenen «Melaninniederschlags», Entfärbung des schwach mit Salzsäure angesäuerten Filtrats mit Thierkohle, Einengen zur Krystallisation, Abtrennung der sich ausscheidenden Krystallmassen, Befreiung des darin enthaltenen Cystins von Kochsalz und Leucin mit Wasser, endlich Trennung vom Tyrosin mit Hülfe sehr stark verdünnter Salpetersäure.

Wie man sieht, weicht dieses Vorgehen von Mörner's ursprünglichem Verfahren (einwöchentliches oder längeres Erhitzen mit Salzsäure auf dem Wasserbad, Trennung des Cystins vom Tyrosin durch fractionirte Krystallisation etc.) in wesentlichen Punkten ab. Dem jüngst mitgetheilten modificirten Verfahren Mörner's steht es jedenfalls näher, ist mit ihm aber, soweit sich beurtheilen lässt, sicher nicht identisch. Als wesentliche Vereinfachung dürfen die Abkürzung der Zersetzungszeit und das Umgehen der Salzsäuredestillation angesehen werden. Wichtig für die rasche Gewinnung reiner Produkte ist auch die Abscheidung der «Melanine», welche anscheinend in der bei der Neutralisation entstehenden concentrirten Salzlösung unlöslich werden.

Die Trennung des Cystins vom Tyrosin mit Hülfe verdünnter Salpetersäure, worin sich ersteres sehr schwer, letzteres sehr leicht löst, führt ungleich rascher zum Ziele, als die von Mörner benutzte fractionirte Krystallisation aus ammoniakhaltigem Wasser.

Aus der nach dem Kochen mit Thierkohle erhaltenen, wenig gefärbten Lösung fiel, wie nebenbei bemerkt sei, neben Cystin auch das Tyrosin und beim weiteren Einengen das Leucin nahezu farblos aus. Das Cystin schied sich nur selten direkt aus der Mutterlauge in den bekannten sechsseitigen Tafeln ab, sondern bildete zunächst meist Kugeln, wie dies schon von Mörner beschrieben wurde.

Löste man das in Kugeln ausgeschiedene Cystin in verdünntem Ammoniak, so schied es sich bei der spontanen Verdunstung des Ammoniaks oder beim vorsichtigen Ansäuern mit Essigsäure in den charakteristischen sechsseitigen Täfelchen ab. In Nadeln krystallisiertes Cystin, wie es von Mörner beschrieben ist, habe ich aus Horn bisher nicht erhalten; dies ist vielleicht auf die kurze Dauer der Säurespaltung zurückzuführen.

Ueber die Einzelheiten des Vorgehens mag nachstehender Auszug aus den Protokollen Aufschluss geben:

500 g käuflicher Hornspäne wurden mit 1500 ccm. reiner concentrirter Salzsäure in einem mit Steigrohr versehenem Kolben circa 5—6 Stunden auf dem Sandbade bis zu kräftigem Sieden erhitzt. Die gewonnene, tief schwarzbraune, nur geringe Mengen ungelöster Substanz enthaltende Flüssigkeit wurde nach dem Abkühlen mit concentrirter Natronlauge unter Vermeidung von stärkerem Erwärmen bis zur deutlich amphoteren Reaction versetzt. Nach 24stündigem Stehen wurde von dem entstandenen schwarzbraunen Niederschlag<sup>1)</sup> abfiltrirt, und das Filtrat nach schwachem Ansäuern mit Salzsäure durch Kochen mit Thierkohle entfärbt. Das so gewonnene schwachsaure Filtrat war völlig klar und von hellgelber Färbung. Nach 24stündigem Stehen in der Kälte hatte sich stets ein reichlicher krystallinischer Niederschlag ausgeschieden, der in der Hauptmasse aus Tyrosin bestand, doch oft auch nicht geringe Mengen Cystin enthielt. Nach Abtrennung dieses Niederschlages wurde die Flüssigkeit auf dem Wasserbade ein wenig eingengt und nach dem Abkühlen von dem neu entstandenen Niederschlage abfiltrirt. Dieses Verfahren wurde einige Male wiederholt, bis die Flüssigkeit auf einige 100 ccm. eingengt war. (Diese letzte Mutterlauge enthielt noch immer viel abspaltbaren Schwefel. Die letzten Krystallisationen sind selbstverständlich immer ausserordentlich kochsalzreich.)

---

<sup>1)</sup> Lässt man die mit Natronlauge versetzte Flüssigkeit zu lange stehen, so enthält der Niederschlag unter Umständen recht erhebliche Mengen Tyrosin und auch Cystin.

geschien lösendermassen. Sie wurden mit wenig kaltem Wasser versetzt, wobei Kochsalz und eventuell Leucin in Lösung gingen; der abfiltrirte Rückstand löste sich bis auf eine meist geringfügige Menge anorganischer Substanz in wenig verdünntem Ammoniak; nach der spontanen Verdunstung des Ammoniaks oder auf Essigsäurezusatz schied sich ein Gemenge aus, das fast ausschliesslich aus Tyrosin und Cystin bestand und ohne erhebliche Verluste mit ganz kaltem Wasser gewaschen werden konnte.

(Die Vertheilung des Cystins resp. des Tyrosins auf die einzelnen Fractionen war übrigens auffällig verschieden. Schied sich auch gewöhnlich die Hauptmasse des Cystins nach der Hauptmasse des Tyrosins aus, so kam doch auch das Umgekehrte vor.)

Das Gemenge von Cystin und Tyrosin wurde mit einer nicht zu geringen Menge kalten Wassers (etwa auf 5 g Substanz 100—200 ccm.) versetzt und nun tropfenweise unter stetem Umrühren verdünnte Salpetersäure hinzugefügt. Hat man, was häufig der Fall ist, ein Gemenge von sechsseitigen Cystintafeln mit Tyrosinnadeln, so kann man die Lösung des Tyrosins mikroskopisch verfolgen und so einen unnöthigen Ueberschuss von Salpetersäure thunlichst vermeiden. Das im Rückstand verbleibende Cystin wird durch Waschen mit kaltem Wasser von der Salpetersäure befreit und nun mehrfach aus Ammoniak in der bekannten Weise umkrystallisirt. Schon nach einmaligem Umkrystallisiren zeigte das Cystin keine Spur Millon'scher Reaction, und andererseits war das Tyrosin, das durch vorsichtiges Neutralisiren der salpetersauren Lösung ausgefällt wurde, frei von abspaltbarem Schwefel.

Die so gewonnenen Cystinpräparate sind in der Regel sehr wenig gefärbt. Behufs weiterer Reinigung wird das Cystin nochmals in salzsaurer Lösung mit Tierkohle behandelt.

Die Ausbeute an Cystin ist bei diesem Verfahren zwar nicht so gross, wie Mörner angibt; bei dem geringen Werth des Ausgangsmaterials wird aber dieser Nachtheil durch die Möglichkeit, grosse Mengen in kurzer Zeit zu verarbeiten, mehr als ausgeglichen.

#### **Gewinnung des Cystins durch Fällung desselben als Kupfersalz.**

Für den Nachweis von Cystin erwies sich noch ein zweiter Weg als gangbar.<sup>1)</sup>

---

1) Auf diesem Wege bin ich zuerst in der Zersetzungsflüssigkeit des Keratins auf Cystin gestossen und auch Herr Dr. Petry schlug diesen Weg ein, um den Nachweis von Cystin bei Pankreasverdauung zu führen.

Bei Verarbeitung der Kochsalz, Leucin und andere Aminosäuren enthaltenden Mutterlaugen wurde gelegentlich ein Theil behufs Bildung von Leucinkupfer mit alkalifreiem Cuprihydroxyd versetzt und vorsichtig auf dem Wasserbade unter stetem Umrühren erwärmt. Schon in der Wärme schied sich aus der tiefblauen Flüssigkeit ein blauer, deutlich von dem überschüssigen Hydroxyd unterscheidbarer Niederschlag ab. Nach dem Erkalten wurde dieser Niederschlag abfiltrirt und ausgewaschen. Es fiel auf, dass er nicht die schön sattblaue Färbung des erwarteten Leucinkupfers hatte, sondern graublau gefärbt war. Mikroskopisch bestand er aus stark lichtbrechenden, blassblau gefärbten Kugeln. Eine Probe des Niederschlags war in kaltem Wasser unlöslich, in viel Salzsäure löste sie sich.

Die Hauptmenge des Niederschlages wurde in Wasser suspendirt und nach Zusatz einiger Tropfen Salzsäure durch Schwefelwasserstoff in der Wärme zerlegt, der Schwefelwasserstoff durch Kochen verjagt. Dabei fiel Cystin in Form von schön durchsichtigen, sechsseitigen Tafeln aus.

Es konnte sich sonach nur um das noch nicht beschriebene Kupfersalz des Cystins gehandelt haben.<sup>1)</sup> In der That erhält man beim Kochen von Cystin in wässriger Suspension oder Lösung mit Cuprihydroxyd sehr leicht die hellgraublaue Kupferverbindung. Dieselbe krystallisirt in verschiedenen Formen; ich beobachtete einmal sechsseitige Täfelchen, die, von der blauen Farbe abgesehen, denen des Cystins völlig glichen, ein anderes Mal lange, schön ausgebildete Nadeln.

#### **Nachweis von Cystein und Cystin unter den Spaltungsprodukten des Eialbumins.**

Meine Versuche, aus echten Eiweissstoffen Cystin darzustellen, erstreckten sich auf Serumeiweiss und Eiereiweiss, von denen namentlich das erstere durch seinen grossen Gehalt an abspaltbarem Schwefel<sup>2)</sup> von vornherein als besonders geeignet zu unsern Versuchen erschien. Ein vorläufiger Versuch wurde ferner mit krystallisirtem Edestin aus Hanfsamen angestellt.

---

1) Hier muss Möerner's Angabe erwähnt werden, dass eine durch Kochen mit Wasser bereitete Cystinlösung mit Kupferacetat eine geringe Fällung gab.

2) Siehe Fr. N. Schulz, Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 30.

der Hornsubstanz um die durch Erhitzen des Eiweisskörpers (Serumalbumin) mit concentrirter Salzsäure erhaltene Zersetzungsflüssigkeit wurde in der oben beschriebenen Weise neutralisirt, bei schwach salzsaurer Reaction mit Thierkohle entfärbt und auf dem Wasserbade eingeeengt. Keine der bei salzsaurer Reaction erhaltenen Krystallisationsfractionen enthielt nach dem Auswaschen mit kaltem Wasser erhebliche Mengen abspaltbaren Schwefels. Der letztere war vielmehr immer nur in den Mutterlaugen nachweisbar.

Es liess sich also kein Cystin durch fractionirte Krystallisation gewinnen und die Untersuchung richtete sich nunmehr auf das Vorhandensein von Cystein.

Für die Gewinnung von Cystein ist eine Reihe von Fällungsmethoden angegeben worden. Brenzinger<sup>1)</sup> fand, dass das salzsaure Cystein mit Quecksilberchlorid in wässriger Lösung eine fast ganz unlösliche Verbindung gibt. Borissow<sup>2)</sup> reducirte durch Behandeln mit Zink und Salzsäure das bei Cystinurie im Harn vorhandene Cystin zu Cystein und fällte diesen Körper ebenfalls durch Sublimat (unter Zusatz von Natriumacetat). Suter<sup>3)</sup> versuchte vergeblich, aus von Hornsubstanz stammenden Tyrosinmutterlaugen unter Verwendung der Fällung mit Sublimat Cystein resp. Cystin zu gewinnen. Derselbe Autor<sup>4)</sup> stellte durch Schütteln mit Benzylchlorid und Natronlauge eine in kaltem Wasser wenig lösliche Benzylverbindung des Cysteins her. Ein Versuch, durch Benzyliren Cystein aus einer Tyrosinmutterlauge zu gewinnen, misslang.<sup>5)</sup> Mörner<sup>6)</sup> verwandte in seiner öfters erwähnten ersten Arbeit wiederum Sublimat sowie Mercuriacetat zur Ausfällung des Cysteins, wobei er zur Abstumpfung der sauren Reaction Natronlauge hinzufügte. Es gelang ihm, auf diese Weise die

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XVI, S. 557.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XIX, S. 511.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 564.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 562.

5) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 576.

6) l. c., S. 612.

bleischwärende Substanz nahezu vollständig in den Quecksilberniederschlag zu bringen. Einen Theil des Cysteins konnte er auch durch Kupferacetat unter Vermeidung eines Ueberschusses ausfällen.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurde auf zweierlei Weise versucht, das Vorhandensein von Cystein unter den Spaltungsprodukten von genuinen Eiweisssubstanzen zu erweisen.

Erstens bemühte ich mich, das Cystein in der Mutterlauge durch Zusatz von Oxydationsmitteln (Eisenchlorid in verschiedenen Mengen und Wasserstoffsuperoxyd) zu Cystin zu oxydiren, um das letztere durch fractionirte Krystallisation zu gewinnen. Zweitens benutzte auch ich die von Brenzinger herrührende und von Suter, Borissow und Mörner<sup>1)</sup> angewandte Quecksilbermethode. Ich wandte vorwiegend Sublimat, in vereinzelt Fällen auch Mercuriacetat an.

Die zahlreichen Versuche, die zu keinem endgültigen Resultat führten, sollen einstweilen ausser Acht gelassen werden; es sei zunächst kurz über den Versuch berichtet, der schliesslich zum Ziele führte:

500 g käufliches Eiereiweiss werden mit 1500 ccm. reiner Salzsäure vom specifischen Gewicht 1,124 durch 8—8½ Stunden auf dem Sandbade zum Sieden erhitzt, nach dem Abkühlen mit Natronlauge unter Vermeiden von stärkerem Erwärmen versetzt, mehrere Tage stehen gelassen und vom entstandenen Niederschlage abfiltrirt; zum amphoter reagirenden Filtrat werden ohne vorhergehende Entfärbung mit Thierkohle ca. 500 g Quecksilberchlorid in warmer, wässriger Lösung (doch unter Vermeidung von stärkerem Erwärmen der Mutterlauge) hinzugefügt; es tritt auch nach einigen Stunden nur eine mässig starke Trübung auf; auf Zusatz einer nicht unerheblichen Menge Natronlauge (bis zur deutlich alkalischen Reaction) tritt ein reichlicher, flockiger, braungefärbter Niederschlag auf, der sich ziemlich rasch zu Boden setzt. Am nächsten Tage wird dieser Niederschlag abgetrennt, zu wiederholten Malen mit reichlichen Mengen kalten Wassers decantirt, auf einem Büchner'schen Filter gut abgesaugt, in etwa 600 ccm. Wasser ohne Säurezusatz suspendirt und mit Schwefelwasserstoff in der Kälte zersetzt. Die vom Sulfidniederschlag abfiltrirte, deutlich sauer reagirende, gelbe Flüssigkeit

---

1) l. c., S. 611.



vom Schwefelwasserston befreit. Sie gibt jetzt folgende Reactionen:

1. Mit Natronlauge und Bleiacetat allmählich eintretende starke Schwefelbleireaction.

2. Mit Eisenchlorid (nachdem die Flüssigkeit zur möglichsten Beseitigung der störenden Gelbfärbung stark mit Wasser verdünnt war) rasch verschwindende Indigoblaufärbung.

3. Mit Natronlauge und Nitroprussidnatrium purpurrothe, bald in Gelb übergehende Färbung.

4. Mit Kupfersulfat intensive, violette, sofort verblassende Färbung, dann Bildung eines graublauen Niederschlags.

5. Bei vorsichtigem Zusatz von Ammoniak eine violettrothe Färbung. (Diese Reaction ist von Andreasch<sup>1)</sup> für Cysteinlösungen bei Gegenwart von Eisen angegeben worden. Die Färbung verschwindet, wenn man die Flüssigkeit ruhig im Reagensglase stehen lässt, nach einigen Minuten, um beim Schütteln mit Luft wiederzukehren und abermals zu verschwinden. Durch Wiederholung des Schüttelns kann man sie dann noch ein- oder mehrere Male in allmählich schwächer werdendem Grade hervorrufen. Aehnliches gibt Andreasch an.)

Die Flüssigkeit wurde jetzt ammoniakalisch gemacht, und während ca. 24 Stunden ein langsamer Luftstrom hindurchgeleitet. Die Eisenchlorid- und die Kupfersulfatreaction sind (selbstverständlich nach voraufgehendem Neutralisiren der Flüssigkeit) schon nach kurzer Zeit nicht mehr deutlich hervorzurufen. Die Nitroprussidreaction ist nach einigen Stunden sehr viel schwächer als vorher, nach 24 Stunden verschwunden.

Ein kleiner Theil der Flüssigkeit wird über concentrirte Schwefelsäure in den Vacuumexsiccator gebracht. Ueber Nacht ist eine kleine Menge von zumeist tyrosinähnlichen Krystallen ausgefallen, die leicht in Ammoniak, sehr schwer in kaltem Wasser löslich sind, aber keine Millon'sche Reaction geben.

Es wird nunmehr die ganze noch vorhandene Flüssigkeit (der Haupttheil war zu anderweitigen Cystindarstellungsversuchen aufgebraucht worden) bei salzsaurer Reaction möglichst rasch auf dem Wasserbad bis auf etwa 40 ccm. eingedampft. Der ziemlich dickflüssige und dunkelbraune Rückstand wurde jetzt ganz schwach ammoniakalisch gemacht, hierauf mit Eisessig bis zur eben sauren Reaction versetzt und auf acht Tage in den Vacuumexsiccator gebracht. Es bildete sich bald eine Trübung, dann ein Niederschlag, der während der nächsten Tage langsam zunahm. Mikroskopisch bestand er aus undurchsichtigen Kugeln, neben amorphen Partikeln.

Nach acht Tagen wurde er abfiltrirt, mehrfach mit kaltem Wasser ausgewaschen, dann in einer geringen Menge verdünnten Ammoniaks

<sup>1)</sup> Maly's Jahresbericht über die Fortschritte der Thierchemie, Bd. 14, 1885, S. 76, Anmerkung.

gelöst, durch vorsichtiges Ansäuern mit Essigsäure wieder ausgefällt und neuerdings so lange gewaschen, bis das ablaufende Waschwasser keine Reaction mit Nessler's Reagens gab.

Der so gewonnene Körper war noch etwas gefärbt; er erwies sich mikroskopisch als durchweg krystallinisch. Die Krystalle hatten in der Hauptmasse die für das Cystin bekannte Form von sechsseitigen Tafeln, daneben fanden sich auch in geringer Menge rhombische Krystalle vor. Die Substanz enthielt reichlich abspaltbaren Schwefel. Eine Stickstoffbestimmung nach Dumas<sup>1)</sup> ergab folgendes Resultat:

0,0906 g der Substanz lieferten bei 23° und einem auf Trockenheit reducirten Barometerstand von 740 mm 9,7 ccm. N = 0,01059 g N = 11,68% N (statt der für Cystin berechneten 11,69% N).

Nach allem diesen kann es keinem Zweifel unterliegen, dass die vorliegende Substanz Cystin war, und dass die Zersetzungsfähigkeit des Quecksilberniederschlags Cystein enthielt, dass also das Cystein ein Spaltungsprodukt des Eieralbumins ist.

Wie beim Eieralbumin gelang es auch beim Serumalbumin und Edestin, nach Zersetzung mit Salzsäure und Quecksilberfällung Cysteinreactionen zu erhalten. Beim Serumalbumin gelangte ich in einem Versuche auch zu krystallinischem Cystin.

Hält man daneben die oben angeführten Befunde Mörner's, so gewinnt es den Anschein, dass jene Eiweissstoffe, welche leicht abspaltbaren Schwefel aufweisen, regelmässig in ihrem Molekül die Cysteingruppe enthalten. Wenn Mörner für die Keratinsubstanzen der Meinung zuneigt, dass sie bereits die Dithioverbindung des Cysteins, das Cystin, enthalten, so kann ich ihm in Hinblick auf die Leichtigkeit, mit der sie bei Spaltung fertiges Cystin liefern, nur beipflichten. Bei den schwefelarmen Eiweissstoffen scheint sich die Sache anders zu verhalten, da hier, wie oben erwähnt, bei kurzdauernder Spaltung nur Cystein auftritt.

---

1) Für die liebenswürdige Ausführung dieser Bestimmung spreche ich auch an dieser Stelle Herrn Hassler, Hilfsarbeiter am chemischen Staatslaboratorium in Hamburg, meinen verbindlichsten Dank aus.

# Der Einfluss des Caffeins und Theobromins auf die Ausscheidung der Purinkörper im Harn.

Von

Martin Krüger und Julius Schmid.

(Aus der medicinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Der Redaction zugegangen am 28. December 1900.)

Der Uebergang von Caffein in den Harn ist von Aubert<sup>1)</sup> beim Menschen nach Genuss von Kaffee, von Maly und Andreasch<sup>2)</sup> bei einem Hunde nach Caffeinfütterung beobachtet und später von E. Rost<sup>3)</sup> einer eingehenden Untersuchung am Menschen, Hunde und Kaninchen unterzogen worden. Dass auch das Theobromin zum Theil unverändert den Organismus passiren kann, ist von Mitscherlich,<sup>4)</sup> Hoffmann,<sup>5)</sup> Rost,<sup>6)</sup> Krüger und Schmidt<sup>7)</sup> festgestellt worden.

Auf die Ausscheidung der Harnsäure hat das Caffein nach Schutzkwer<sup>8)</sup> und Minkowski<sup>9)</sup> keinen Einfluss. Wie sich Theobromin in dieser Hinsicht verhält, ist noch unbekannt. Wichtiger als jene Beobachtungen über die theilweise Beständigkeit des Caffeins und Theobromins im thierischen Stoffwechsel ist der von Albanese,<sup>10)</sup> Bondzynski und Gottlieb<sup>11)</sup> ermittelte Befund, dass diese beiden, in den Genussmitteln vorkommenden Xanthinbasen im Organismus durch

1) Pflüger's Archiv, Bd. V, S. 589.

2) Monatshefte für Chemie, Bd. IV, S. 384.

3) Archiv für exper. Pathologie u. Pharmakol., Bd. XXXVI, S. 64.

4) Nach Rost, l. c., S. 65.

5) Archiv für exper. Pathologie u. Pharmakol., Bd. XXVIII, S. 1.

6) l. c., S. 70.

7) Berichte der deutschen chem. Gesellsch., Bd. XXXII, S. 2677.

8) Inaug.-Dissert., Königsberg, 1882.

9) Archiv für exper. Pathologie u. Pharmakol., Bd. XXXI, S. 406.

10) Archiv für exper. Pathologie u. Pharmakol., Bd. XXXV, S. 447.

11) ibidem., Bd. XXXVI, S. 45.

Beseitigung von Methylgruppen in niedere Homologe des Xanthins übergehen und somit zur Bildung von Purinbasen Veranlassung geben, welche sich gegen ammoniakalische Silberlösung und gegen Kupferoxydulsalze wie die aus dem Zerfall der Nucleine herrührenden und im Harn erscheinenden Nucleinbasen verhalten.

Geht aus dem Mitgetheilten schon mit Sicherheit hervor, dass Caffein und Theobromin eine Vermehrung der Purinbasen im Harn bewirken müssen, so liegen über die Grösse dieser Vermehrung bisher zwei Beobachtungen vor. Albanese<sup>1)</sup> hat nach Einnahme von 2 g Caffein innerhalb drei Tagen mit dem Harn 0,2 g Purinbasen ausgeschieden. Die normale Ausscheidung bei Enthaltung von Kaffee etc. betrug bei ihm innerhalb zwei Tagen 0,03 g, innerhalb drei Tagen demnach 0,045 g. Die Einnahme von 2 g Caffein hat eine Vermehrung der Purinbasen um 0,155 g bewirkt.

Ferner haben Burian und Schur<sup>2)</sup> den Einfluss von Kaffee auf die Vermehrung des Purinbasenstickstoffes festgestellt. Sie haben sich hierbei einer modificirten Salkowski'schen Methode bedient und gefunden, dass 35—40% des Caffeinstickstoffes in Harnpurinstickstoff übergehen.

Wir haben in derselben Weise wie Burian und Schur den Einfluss des Caffeins auf die Purinbasenausscheidung durch die Bestimmung der Zunahme an Basenstickstoff ermittelt; nur haben wir statt Kaffee reines Caffein gegeben. Die von uns angewendete Methode zur Bestimmung der Harnsäure und Basen war dieselbe, wie Krüger und Schmidt<sup>3)</sup> zur Isolirung der Purinkörper aus Harn angewendet haben; d. h. der Harn wird siedend heiss mit Kupfersulfat und Bisulfit ausgefällt. Die aus dem Kupferniederschlag durch Natriumsulfid und Ansäuern mit Salzsäure isolirten Purinbasen werden von der nach mehrstündigem Stehen ausgeschiedenen Harnsäure durch Filtration getrennt. Nachdem der Rest der Harnsäure durch Oxydation mit Braunstein in essigsaurer Lösung zerstört ist,

---

1) l. c., S. 460.

2) Archiv für die ges. Physiol., Bd. LXXX, S. 321,

3) Berichte der deutschen chem. Gesellsch., Bd. XXXII, S. 2677.

Kuprierreagens bestimmt.

Der Patient, welcher sich für unsere Zwecke bereitwilligst zur Verfügung stellte, war ein 16jähriger Knabe, Fr. Fr., von 42,1 Kilo (Dystroph. muscul.).

Er hatte schon mehrere Wochen vor dem Versuche eine möglichst gleichmässige Nahrung erhalten, welche auch während des Versuches beibehalten wurde und frei von caffen- und theobrominhaltigen Genussmitteln war. Dieselbe bestand aus 250 g Fleisch, 2 Eiern, 1 Liter Milch, 60 g Butter, 200 g Brod und 1 Flasche Bier. In der Wahl des Fleisches wurde dem Patienten eine gewisse Freiheit gelassen, insofern er zwischen Kalbsschnitzel, Schinken, Wurst und gehacktem Rindfleisch wählen durfte.

Um die Ausscheidung an Harnsäure und Basen nach genannter Kost kennen zu lernen, wurde der Harn unseres Patienten zunächst während eines Zeitraumes von 13 Tagen einer täglichen Untersuchung auf die genannten Körper, wie auf Gesamtstickstoff unterzogen, und zwar wurden alle Werthe für Gesamtstickstoff (Ges.-N), Harnsäurestickstoff ( $\bar{U}$ .-N) und Basenstickstoff (B.-N) durch je 2 Analysen ermittelt, deren Mittelzahlen in Tabelle I, Seite 107, angegeben sind.

Die mittlere <sup>1)</sup> Ausscheidung an Harnsäure-N betrug demnach bei unserem Patienten 0,2220 g, an Basen-N 0,0166 g. Das Verhältniss von Gesamt-N zu Harnsäure-N ist im Mittel 53,7:1, das von Harnsäure-N zu Basen-N 13,5:1.

Die täglichen Werthe für Harnsäure-N schwanken von 0,1882 bis 0,2510 g. Die Werthe für Basen-N bewegen sich innerhalb der Grenzen 0,0143 und 0,0188 g. Es ist zweifellos, dass eine auch in Bezug auf die Art des Fleisches vollkommen gleichmässige Kost die Differenzen zwischen den Harnsäurewerthen herabdrücken und damit auch das Verhältniss von Harnsäure-N zu Basen-N, welches bei unserem Patienten von 11,9:1 bis 15,1:1 schwankt, constanter machen würde.

---

<sup>1)</sup> Bei Berechnung der Mittelwerthe mussten die Zahlen vom 18./19. III. wegfallen, weil an diesem Tage ein Theil des Harnes verloren gegangen war.

Tabelle I.

Tag	Harn- menge	Ges.-N	$\bar{U}$ -N	B.-N	$\frac{\text{Ges.-N}}{\bar{U}\text{-N}}$	$\frac{\bar{U}\text{-N}}{\text{B.-N.}}$
1900						
8.-9. III.	550 ccm.	9,24 g	0,1882 g	0,0143 g	49,0 : 1	13,1 : 1
9.-10. III.	673 "	11,17 "	0,2151 "	0,0174 "	51,9 : 1	12,4 : 1
10.-11. III.	770 "	10,23 "	0,1912 "	0,0151 "	53,5 : 1	12,6 : 1
11.-12. III.	842 "	11,43 "	0,2058 "	0,0150 "	55,5 : 1	13,7 : 1
12.-13. III.	975 "	10,48 "	0,2183 "	0,0150 "	48,0 : 1	14,6 : 1
13.-14. III.	955 "	13,97 "	0,2510 "	0,0184 "	55,6 : 1	13,6 : 1
14.-15. III.	850 "	14,31 "	0,2413 "	0,0174 "	59,2 : 1	13,9 : 1
15.-16. III.	800 "	14,14 "	0,2274 "	0,0169 "	62,2 : 1	13,5 : 1
16.-17. III.	698 "	12,56 "	0,2236 "	0,0188 "	56,1 : 1	11,9 : 1
17.-18. III.	675 "	12,59 "	0,2285 "	0,0164 "	55,1 : 1	13,9 : 1
18.-19. III.	485 "	9,01 "	0,1433 "	0,0128 "	62,8 : 1	11,2 : 1
19.-20. III.	705 "	11,78 "	0,2256 "	0,0171 "	52,7 : 1	13,2 : 1
20.-21. III.	748 "	11,77 "	0,2467 "	0,0163 "	47,7 : 1	15,1 : 1
Mittelwerte:	770 ccm.	11,98 g	0,2220 g	0,0166 g	53,7 : 1	13,5 : 1

Tabelle II.

Tag	Harn- menge	Ges.-N	$\bar{U}$ -N	B.-N	$\frac{\text{Ges.-N}}{\bar{U}\text{-N}}$	$\frac{\bar{U}\text{-N}}{\text{B.-N}}$	Bemerkungen
1900							
21.-22. III.	1010 ccm.	13,07 g	0,2185 g	0,0221 g	59,8 : 1	9,9 : 1	0,05 g Caffein täglich
22.-23. III.	675 "	11,64 "	0,2002 "	0,0205 "	58,1 : 1	9,8 : 1	
23.-24. III.	690 "	11,87 "	0,2061 "	0,0206 "	57,6 : 1	10,0 : 1	
24.-25. III.	720 "	11,48 "	0,2049 "	0,0209 "	56,0 : 1	9,8 : 1	
25.-26. III.	735 "	10,29 "	0,1924 "	0,0229 "	53,5 : 1	8,4 : 1	
26.-27. III.	610 "	11,55 "	0,2212 "	0,0216 "	52,2 : 1	10,2 : 1	0,1 g Caffein täglich
27.-28. III.	775 "	10,86 "	0,2304 "	0,0212 "	47,1 : 1	10,9 : 1	
28.-29. III.	660 "	12,01 "	0,2233 "	0,0261 "	53,8 : 1	8,6 : 1	
29.-30. III.	820 "	13,76 "	0,2317 "	0,0240 "	59,4 : 1	9,6 : 1	
30.-31. III.	960 "	13,77 "	0,2142 "	0,0272 "	64,4 : 1	7,9 : 1	
31. III.-1. IV.	650 "	11,85 "	0,2085 "	0,0164 "	56,8 : 1	12,7 : 1	kein Caffein
1.-2. IV.	915 "	13,37 "	0,2557 "	0,0195 "	52,3 : 1	13,1 : 1	
2.-3. IV.	698 "	12,83 "	0,2106 "	0,0175 "	60,9 : 1	12,1 : 1	
3.-4. IV.	835 "	14,52 "	0,2500 "	0,0192 "	58,1 : 1	13,0 : 1	
4.-5. IV.	795 "	14,08 "	0,2390 "	0,0285 "	58,9 : 1	8,4 : 1	
5.-6. IV.	810 "	14,94 "	0,2307 "	0,0279 "	64,8 : 1	8,3 : 1	0,2 g Caffein täglich

Patient an 4 Tagen je 0,05 g Caffein, dann unmittelbar darauf an 6 Tagen je 2 mal 0,05 g Caffein. Alsdann folgte eine Periode von 4 Tagen mit Ausschluss des Diureticums, und schliesslich eine solche von 2 Tagen, an welchen der Patient täglich 2 mal 0,1 g des Medicamentes erhielt.

Auch bei diesen Versuchsreihen wurden stets Doppelanalysen ausgeführt, deren Mittelwerthe in Tabelle II, Seite 107, angegeben sind.

Die Resultate ergeben sich ohne Weiteres bei Durchsicht der Tabelle III, welche die Mittelzahlen der 5 Versuchsperioden enthält.

Tabelle III.  
Mittelzahlen der Caffein-Versuchsperioden.

Tage	Harn- menge	Ges.-N	$\bar{U}$ -N	B.-N	Ges.-N	$\bar{U}$ -N	Bemerkungen
					$\bar{U}$ -N	B.-N	
1.-13. Tag	770 ccm.	11,98 g	0,2220 g	0,0166 g	53,7 : 1	13,5 : 1	kein Caffein
14.-17. „	774 „	12,01 „	0,2074 „	0,0210 „	57,9 : 1	9,9 : 1	0,06 g Caffein täglich
18.-23. „	759 „	12,04 „	0,2188 „	0,0240 „	55,5 : 1	9,3 : 1	0,1 g Caffein täglich
24.-27. „	774 „	13,14 „	0,2312 „	0,0181 „	57,0 : 1	12,7 : 1	kein Caffein
28.-29. „	802 „	14,51 „	0,2348 „	0,0282 „	61,8 : 1	8,35 : 1	0,2 g Caffein täglich

Was zunächst die Abhängigkeit der Harnsäureausscheidung von der Caffeeinnahme betrifft, so zeigt sich in Uebereinstimmung mit den Angaben von Schutzkwer und Minikowsky, dass das Caffein keine Vermehrung der Harnsäureausfuhr bewirkt. Beim Uebergang der Vorperiode zur ersten Caffeinperiode ist sogar Harnsäure-N von 0,222 g auf 0,2074 g zurückgegangen, um in der zweiten, sechs Tage dauernden Caffeinperiode sich dem normalen Werthe um wenige Milligramme zu nähern. Die geringe Zunahme an Harnsäure-N, 3,6 mg, welche in der letzten Caffeinperiode gegenüber der vorhergehenden normalen Periode zur Ausscheidung gelangt ist, ist zweifellos nicht auf das Caffein zurückzuführen, sondern steht im Zusammenhang mit dem Plus an Gesamtstickstoff.

Dagegen vermehrt das Caffein in deutlicher Weise die

Purinbasen des Harnes. Nach Eingabe von nur 0,050 g Caffein steigt der Stickstoff derselben von 0,0166 g auf 0,0210 g, nach Eingabe von 0,1 g Caffein auf 0,024 g an. Eine Dosis von 0,2 g Caffein treibt den Purinbasen-N von 0,0181 g auf 0,0282 g.

Rechnet man die Zunahme an Purinbasen-N in Procenten vom eingegebenen Caffeinstickstoff um, so ergibt sich, dass

- |    |                                 |       |                     |
|----|---------------------------------|-------|---------------------|
| 1. | bei Eingabe von 0,050 g Caffein | 33,3% | seines Stickstoffes |
| 2. | „ „ „ 0,100 „ „                 | 28,0% | „ „                 |
| 3. | „ „ „ 0,200 „ „                 | 19,3% | „ „                 |

als Purinbasenstickstoff im Harne ausgeschieden werden.

Somit ist die Zunahme an Basenstickstoff nicht proportional der eingeführten Menge an Caffein, sondern mit steigenden Dosen des letzteren nimmt die procentische Umwandlung in niedere Homologe des Xanthins ab.

Wie stehen diese Resultate im Einklang mit den Angaben von Burian und Schur, sowie von Albanese? Burian und Schur haben während drei Tagen den Aufguss von 160 g Kaffee, welcher 1,0—1,2 g Caffein enthält, getrunken und danach eine Steigerung des Purinbasen-N gefunden, welche 35—40% des eingeführten Caffein-N entspricht. Diese Zahlen übertreffen die nach unseren Resultaten zu erwartenden Werthe bedeutend. Doch dürften unsere Angaben nicht ohne Weiteres mit denen der genannten Autoren zu vergleichen sein, weil letztere, wie erwähnt, Kaffeeaufguss genommen, wir dagegen reines Caffein gegeben haben.

Bei dem Versuche von Albanese wurden die Purinbasen nach Einnahme von 2 g Caffein innerhalb drei Tagen um 0,155 g vermehrt. Da die nach Caffein auftretenden Purinbasen aller Wahrscheinlichkeit nach auch beim Menschen, wie beim Hunde und Kaninchen,<sup>1)</sup> aus einem Gemenge von Dimethylxanthin und Monomethylxanthinen bestehen werden, so wird denselben ein Stickstoffgehalt von etwa 32,4% (Mittel von Dimethylxanthin und Monomethylxanthin) zukommen müssen. Hieraus berechnet sich, dass 9—10% des Caffein-N beim Albanese-

<sup>1)</sup> M. Krüger, Bericht der deutschen chem.-Gesellsch., Bd. XXXII, S. 2818 und 3336.



unseren Resultaten im Einklang steht.

Die Unabhängigkeit der Harnsäureexcretion und das Anwachsen der Purinbasen nach Caffeinzufuhr kommt in schöner Weise in dem Absinken des Verhältnisses von Harnsäure-N zu Basen-N zum Ausdruck. Dasselbe beträgt normal 13,5:1 resp. 12,7:1 (siehe die 2. normale Periode) und fällt ab auf 9,9:1, 9,3:1 und schliesslich nach Eingabe von 0,2 g Caffein auf 8,35:1.

Von weit grösserem Einfluss auf die Basenausscheidung mit dem Harne als das Caffein erweist sich das Theobromin. Derselbe Patient erhielt nach 3tägiger Pause, während welcher die Erscheinungen der Caffeinverabreichung verschwunden mussten, am 9. und 10. April je 0,4 g Theobromin.

Tabelle IV.

Versuch mit Theobromin.

Tag	Harn- menge	Ges.-N	U.-N	B.-N	Ges.-N Ü.-N	Ü.-N B.-N	Bemerkungen
1900							
9.-10. IV.	660 ccm.	10,79 g	0,1848 g	0,0642 g	58,4 : 1	2,9 : 1	} 0,4 g Theobromin täglich
10.-11. IV.	815 "	12,95 "	0,1927 "	0,0858 "	67,0 : 1	2,25 : 1	
Mittelwerthe:	738 ccm.	11,87 g	0,1890 g	0,0750 g	62,7 : 1	2,6 : 1	

Gleich dem Caffein vermehrt Theobromin die Harnsäureexcretion nicht. Der Harnsäure-N beträgt nur 0,1890 g, ist also noch unter dem Harnsäurewerth der ersten caffeinfreien Periode, welche den gleichen Gesamt-N-Werth zeigt, herabgegangen. Dagegen ist der Basenstickstoff gewaltig gestiegen am ersten Tage auf 0,0642 g, am zweiten auf 0,0858 g; zweifellos wird eine Vermehrung auch noch am dritten Tage — ohne weitere Zufuhr von Theobromin — wahrzunehmen sein. Entsprechend dem Anwachsen des Purinbasen-N ist das Verhältniss von Harnsäure-N zu Purinbasen-N bis auf 2,6:1 im Mittel gefallen, d. h. der Basenstickstoff beträgt mehr als den dritten Theil des Harnsäurestickstoffes. Nicht weniger als 47% des eingeführten Theobromin-N erscheint im Harne als Purinbasen-N wieder.

# Ueber die Ausscheidung des Antipyrins aus dem thierischen Organismus.

Von

**D. Lawrow.**

---

(Aus dem Institut für medicin. Chemie und experimentelle Pharmakologie  
zu Königsberg i. Pr.)

(Der Redaction zugegangen am 5. Januar 1901.)

---

Welche Veränderungen das Antipyrin im thierischen Organismus erleidet, in welcher Form resp. in welcher Verbindung dasselbe, nach Einführung in den thierischen Organismus, denselben verlässt, sind Fragen, welche nach den Litteraturangaben bisher noch wenig bearbeitet worden sind.

Nach Fr. Müller<sup>1)</sup> lässt sich aus dem Harne kranker Menschen, nach Eingabe von Antipyrin, dasselbe in unveränderter Form nur in sehr unbedeutenden Mengen darstellen. Ausserdem steigt nach diesem Autor nach beträchtlichen Antipyringaben die Menge der gebundenen Schwefelsäure im Harn von Menschen (Kranken) bis zur Hälfte der gesammten.

Nach Umbach<sup>2)</sup> wird beim Menschen durch das Antipyrin die Aetherschwefelsäure nur wenig vermehrt; dies aber ist beim Hunde in deutlicher Weise der Fall.

Nach A. Cahn<sup>3)</sup> zeigte der Antipyrinharn der Menschen (Kranker) nie eine Verfärbung. Wiederholt vorgenommene Untersuchungen ergaben, dass derselbe nach grösseren Dosen die Polarisationsebene nicht drehte und mit Säuren gekocht

---

1) Centralbl. für klinische Medicin, 1884, Nr. 36.

2) Arch. für experiment. Pathol. und Pharmakol., 1885, VII., S. 161—168.

3) Berlin. klin. Wochenschr., 1884, Nr. 36.

Autor, keine gepaarte Glycuronsäure. Das Verhältniss der anorganischen Sulfate zur Aetherschwefelsäure betrug in einem Versuche nach Darreichung von 5,0 g 19 : 1, bei einem zweiten nach 4,0 g 12 : 1, war also dasselbe, wie in der Norm.

In Anbetracht des Interesses, welches das Schicksal des Antipyrins, einer verhältnissmässig complicirten Verbindung, im thierischen Organismus darbietet, sowie in Anbetracht der geringen Zahl und der ungenügenden Resultate der bisherigen Bearbeitung dieser Frage wurde die vorliegende Untersuchung vorgenommen.

Für die anfänglichen Versuche wurde ein junger augenscheinlich gesunder Hund gewählt; das Gewicht desselben betrug 35,5 kg; er erhielt Antipyrin von 4 g bis 10 g pro die und zwar in Gaben von 1,5 g bis 3,0 g. Im Verlaufe zweier Fütterungsperioden, von denen jede 2—2½ Wochen dauerte, wurden 200,0 g Antipyrin verfüttert. Die zweite Periode wurde 2 Wochen nach Ablauf der ersten angefangen. Als Nahrung diente dem Hunde Pferdefleisch und zwar ungefähr 1 kg pro die. An Wasser erhielt das Thier 1 bis 1,5 Liter. Während der zweiten Hälfte einer jeden Fütterungsperiode verminderte sich der Appetit des Thieres beträchtlich; der Hund erschien träge.

Im Verlauf des gesammten Versuches sank sein Gewicht um 2,3 kg. Sofort nach Beginn der Antipyrineingaben wies der Harn des Thieres folgende zwei besonders bemerkenswerthe Eigenschaften auf: mit einer wässerigen Lösung von Eisenchlorid gab er Tokayerfarbe und drehte die Ebene des polarisirten Lichts nach links und zwar von 0,15 bis 0,5° (l = 1 dm), je nach der Menge der vom Thiere pro die eingenommenen Antipyrins, sowie je nach der Menge des pro die ausgeschiedenen Harns. Die Linksdrehung ging beim Kochen mit 2—5%iger Salzsäure oder Schwefelsäure in eine Rechtsdrehung über.

Manchmal gab der Harn die Trommer'sche Zuckerprobe, andere Male nicht; der mit 2—5%iger Salz- oder Schwefelsäure gekochte Harn ergab stets ein positives Resultat der

Probe. Zum Ende einer Versuchsperiode trat im Harn des Hundes Eiweiss in unbedeutenden Mengen auf, doch fanden sich im Sediment keine Cylinder.

Der Harn des Hundes wurde folgendermaassen mit Eisenchlorid geprüft: zu dem in der Regel alkalischen Harn wurde eine Lösung von Eisenchlorid so lange allmählich hinzugesetzt, bis sich ein gelbgefärbter Niederschlag bildet. Das Gemisch wurde filtrirt und zum Filtrat das Reagens bis zum Maximum der Färbung zugefügt. Gewöhnlich nahm die letztere beim Stehen nach einer Stunde etwas an Intensität zu.

Es erwies sich ferner, dass im Harn des Hundes Antipyrin als solches nicht enthalten war, oder dasselbe nur in sehr unbedeutenden Mengen nachgewiesen werden konnte. Zwecks Darstellung des Antipyrins aus dem Harn des Hundes wurde folgendermaassen verfahren: eine Portion Harn, welche 5—7 g dem Thiere eingeführten Antipyrins entsprach, wurde bei 55—65° C. eingeengt, mit Salzsäure angesäuert und in einem Extractionsapparat so lange mit Chloroform extrahirt, als noch bei der Extraction irgend etwas von der Substanz überging. Das Chloroformextract wurde bis zur Trockene eingedampft, wobei eine harzartige, intensiv braunroth gefärbte Masse nachblieb, welche sich ausser in Chloroform leicht in heissem Aether, in heissem Alkohol und in Alkalien löste. Diese Masse wurde so lange mit heissem Wasser extrahirt, als noch etwas ins Wasser überging. Die Wassereextracte wurden vereinigt und nach Zusatz von Thierkohle bei 60—65° auf 25—30 ccm. eingeengt. Die erhaltene farblose Lösung wurde mit Eisenchlorid, Millon's Reagens,  $\text{KNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ , Phosphorwolframsäure und anderen geprüft. Zwei derartige Versuche ergaben, dass die endgültige, auf 25—30 ccm. eingeengte wässrige Lösung mit den erwähnten Reagentien weit schwächere Farb- und Niederschlagsreactionen gab, als eine 0,5%ige wässrige Lösung von Antipyrin.

Die fast vollkommene Abwesenheit des Antipyrins als solchen im Harn, sowie die Linksdrehung des letzteren liessen vermuthen, dass das Antipyrin, zum mindesten theilweise, entweder als solches oder aber in veränderter Gestalt, jedoch in

Verbindung mit Glycuronsäure, den Organismus des Hundes verlässt.

Versuche erwiesen, dass diese gepaarte Glycuronsäure zum grössten Theil durch ein Aetheralkoholgemisch, durch Bleiessig und durch Aetzbaryt, besonders in Gegenwart von Alkohol, aus dem Harn gefällt wird.

Der folgende Versuch zeigt die Fällbarkeit der besprochenen Säure durch Alkohol und Aether: 500 ccm. Anti-pyrinarn, mit einem Drehungsvermögen von  $0,20^\circ$ , wurden auf einem Wasserbade bei  $55-60^\circ \text{C.}$  auf 55 ccm. eingengt. Die erhaltene Lösung wurde mit 220 ccm. 95%igem Alkohol und 220 ccm. Aether vermengt. Das Gemisch gab nach 24stündigem Stehen im Eisschrank einen stark gefärbten, klebrigen, theilweise krystallinischen Niederschlag. Nachdem die wässrige Alkoholätherlösung vom Niederschlage abgegossen worden war, wurde der letztere in Wasser aufgelöst; die wässrige Lösung wurde durch Thierkohle entfärbt und auf 50 ccm. eingengt. Die erhaltene Lösung wies Linksdrehung auf und zwar  $-1,61^\circ$ , bei  $l = 1 \text{ dm.}$  Auf die genannte Weise wurde somit ca. 80% der gepaarten Glycuronsäure gefällt. Beim weiteren Hinzufügen von 110 ccm. Aether zu der abgegossenen wässrigen Alkoholätherlösung entstand ein krystallinischer Niederschlag, welcher bedeutende Mengen Harnstoff enthielt. Der von der Lösung abgeschiedene Niederschlag wurde in Wasser aufgelöst, die Lösung durch Thierkohle entfärbt und auf 50 ccm. eingengt. Sie ergab eine Drehung der Polarisationssebene von  $-0,32^\circ$  (bei  $l = 1 \text{ dm.}$ ). Ein bedeutender Theil der gepaarten Glycuronsäure kann somit aus dem Harn durch Alkohol und Aether gefällt werden.

Es erwies sich fernerhin, dass die Salze dieser gepaarten Säure beim Eindampfen auf dem kochenden Wasserbade verhältnissmässig leicht zersetzt werden: 87 ccm. der wässrigen Lösung des Niederschlags, welcher bei der Fällung des eingengten Harns mit Alkohol erhalten worden war und eine Linksdrehung von  $0,58^\circ$  (bei  $l = 1 \text{ dm.}$ ) aufwies, wurde auf dem kochenden Wasserbade auf 6—7 ccm. eingengt, wobei ein dunkelbrauner Niederschlag entstand. Die erhaltene Lösung

wurde mit Wasser bis auf 87 ccm. verdünnt, mit Thierkohle vermischt und filtrirt; das Filtrat ergab eine Linksdrehung von  $0,42^\circ$  (bei  $l = 1$  dm.).

Die besprochene gepaarte Glycuronsäure wird aus dem mit Schwefelsäure schwach angesäuerten Harn durch ein Gemisch von Alkohol und Aether extrahirt, wie es der folgende Versuch zeigt. Zu 60 ccm. Antipyrinharns, welcher eine Linksdrehung von  $-0,42^\circ$  zeigte, wurde nach Ansäuerung desselben mit Schwefelsäure ein Gemisch von Alkohol und Aether, bestehend aus einem Volumen 95%igen Alkohols und zwei Volumen Aether so lange zugesetzt, bis das neue Gemisch homogen wurde, so dass sich beim Stehen keine wässerige Schicht absetzte. Zu diesem Gemisch wurde nun soviel Aether hinzugefügt, dass sich beim Schütteln desselben eine wässerige, ungefähr 30 ccm. betragende Schicht bildete. Die Aetheralkohollösung wurde abgeschieden, der Aether und der Alkohol bei  $45-55^\circ$  entfernt; die resultirende wässerige auf 15 ccm. eingedampfte Lösung wies eine Drehung von  $-1,37^\circ$  auf. Bei dieser Probe wurde somit durch das Aetheralkoholgemisch ungefähr 80% der gepaarten Glycuronsäure extrahirt.

Zwecks Darstellung der gepaarten Säure in grösseren Mengen aus dem Harn wurde folgendes Verfahren angewandt. Zu dem auf dem Wasserbade bei  $60-65^\circ$  C. eingengten Harn wurde so lange eine wässerige Lösung von Bleiacetat zugesetzt, bis der Niederschlag auch beim längeren Stehen keine Zunahme mehr zeigte. Das sauer reagirende Gemisch wurde im Verlauf von 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und darauf filtrirt. Zum Filtrat wurde so lange eine wässerige Lösung von Bleiessig zugesetzt, als eine Probe des Filtrats noch Linksdrehung aufwies.

Es bleibt zu bemerken, dass bei diesen Versuchen, und zwar bei 4 Versuchen, es niemals gelang, die linksdrehende Substanz vollkommen zu fällen, weder durch Bleiessig allein, noch durch nachträglichen Zusatz von Ammoniaklösung.

Der abfiltrirte Bleiessigniederschlag wurde dreimal sorgfältig mit kaltem, destillirtem Wasser ausgewaschen, wobei der Niederschlag nach jedesmaligem Auswaschen sorgfältig

ging ein Theil des Niederschlags in die wässrige Lösung, welche eine schwache Linksdrehung der Polarisationssebene zeigte. Der ausgewaschene Niederschlag wurde nach Möglichkeit rasch durch verdünnte Schwefelsäure zersetzt, wobei ein bedeutenderer Ueberschuss der letzteren vermieden wurde. Die erhaltene Lösung wurde so rasch wie möglich filtrirt; sie enthielt stets Salzsäure in nicht unbedeutenden Mengen.

Diese Lösung wurde sofort mit Barytwasser neutralisirt, auf dem Wasserbade bei 55—60° erwärmt und filtrirt. Das neue Filtrat wurde auf dem Wasserbade bei 55—60° eingengt, mit Aetzbaryt übersättigt und darauf zunächst mit 95%igem Alkohol, alsdann mit Aether so lange vermengt, als noch ein Niederschlag entstand. Bei der Fällung einer derartigen mit Aetzbaryt übersättigten Lösung von 550 ccm. wurden 650 ccm. 95%igen Alkohols und 600 ccm. Aether zugefügt.

Das Gemisch wurde nach sorgfältigem Umrühren 12 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und durch ein Faltenfilter filtrirt. Der Niederschlag wurde sorgfältig mit Filtrirpapier abgepresst, mit Wasser geschüttelt und mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt, bis neutrale oder amphotere Reaction eintrat. Die vom schwefelsauren Baryum getrennte, durch Thierkohle nach Möglichkeit stark entfärbte Lösung wurde auf dem Wasserbade bei 55—60° bis zur Syrupconsistenz eingengt. Sie ging nach längerem Stehen bei Zimmertemperatur oder im Eisschrank allmählich in eine krystallinische Masse über. Dieselbe wurde von der Mutterlauge durch Absaugen getrennt und 1—2 mal unter Zusatz von Thierkohle umkrystallisirt. Die Krystalle hatten die Gestalt feiner, büschelförmig gruppirter Nadeln.

Die auf diese Weise abgeschiedene Substanz löst sich leicht in Wasser bei gewöhnlicher Temperatur, ist jedoch nicht hygroskopisch. Die Analyse der einmal umkrystallisirten, zunächst im Vacuumexsiccator und darauf bei 100° bis zum constanten Gewicht getrockneten Substanz ergab folgende Daten:

0,5190 g Substanz gaben 0,1335 g AgCl  
 0,5012 g     "     "     0,2075 g BaSO<sub>4</sub>  
 0,787 g     "     "     35,8 ccm. N<sub>2</sub> bei t = 23° und B = 766 mm.

Es wurden also gefunden:

Cl = 6,36 %  
 Ba = 24,34 %  
 N = 5,17 %.

Die Analyse der zweimal umkrystallisirten Substanz ergab folgende Daten:

0,6892 g Substanz gaben 0,2875 g BaSO<sub>4</sub> und 0,1747 g AgCl  
 0,4408 g     "     "     beim Verbrennen 0,1620 g H<sub>2</sub>O und 0,594 g CO<sub>2</sub>  
 0,5437 g     "     "     "     "     0,1945 g H<sub>2</sub>O und 0,7257 g CO<sub>2</sub>  
 0,5820 g     "     "     24,6 ccm. N<sub>2</sub> bei t = 23° und B = 764 mm.

Die Analysenzahlen weisen somit auf ein Doppelsalz von BaCl<sub>2</sub> und dem Baryumsalz einer gepaarten Glycuronsäure von der Zusammensetzung (C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)<sub>2</sub>Ba + H<sub>2</sub>O hin.

	Berechnet	Gefunden	
für (C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> Ba + BaCl <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O			
C	36,40 %	36,76 %	36,42 %
H	3,57 %	4,08 %	3,97 %
N	4,99 %		4,79 %
Ba	24,44 %	24,53 %	
Cl	6,38 %	6,27 %	

Eine gepaarte Glycuronsäure von der beschriebenen Zusammensetzung würde entstehen durch Zusammentritt von Glycuronsäure mit einem Oxyantipyrin unter Wasseraustritt.

Ueber die Stellung der Hydroxylgruppe kann natürlich, so lange der Paarling nicht näher untersucht ist, nichts ausgesagt werden.

Die wässerige von Baryt befreite, mit Aetznatron stark alkalisch gemachte Lösung des genannten Baryumdoppelsalzes löst CuSO<sub>4</sub> auf; sie reducirt dieses Salz beim Kochen nicht.

Die mit 5%iger Salz- oder Schwefelsäure gekochte und mit Aetznatron alkalisch gemachte wässerige Lösung reducirt jedoch CuSO<sub>4</sub>.

Die wässerigen Lösungen des Salzes geben mit Eisenchlorid eine Tokayerfarbe, mit Millon'schem Reagens die Millon'sche Reaction.



Baryumdoppelsalzes wurde mit dem Halbschattensaccharimeter, mit zweitheiligem Gesichtsfelde (Schmidt-Haensch) bestimmt. In der folgenden Tabelle sind die Befunde dieser Bestimmungen angeführt, wobei die Grösse ( $\alpha$ ) in Kreisgraden ausgedrückt ist und zwar für  $l = 1$  dcm.

p	d	( $\alpha$ )	( $\alpha$ ) D für $(C_{17}H_{19}N_3O_8)_2Ba + BaCl_2 + H_2O$	( $\alpha$ ) D für $(C_{17}H_{19}N_3O_8)_4Ba$
11,451	1,06721	— 4,80°	— 39,33°	— 49,33°
5,605	1,03026	— 2,47°	— 42,82°	— 53,63°
2,805	1,01471	— 1,26°	— 44,36°	— 55,56°

Die wässrige Lösung des gegebenen Baryumdoppelsalzes zeigt somit Linksdrehung; die spezifische Drehung nimmt beim Verdünnen der Lösungen zu.

Die Anwesenheit von Chlorbaryum in diesem Doppelsalz erscheint insofern interessant, als das in das Doppelsalz eingehende Chlorbaryum die Krystallisation des neutralen Barytsalzes der gepaarten Glycuronsäure aus ihren anfänglichen, unreinen Lösungen begünstigt, wie es der folgende Versuch zeigt. Zu 275 ccm. einer Lösung, welche bei der Zersetzung eines Bleiessigniederschlags erhalten, mit  $Ba(OH)_2$  neutralisirt worden war und eine Linksdrehung von  $-2,95^\circ$  aufwies, wurde eine wässrige Lösung von  $Ag_2SO_4$  so lange hinzugefügt, als die Lösung mit  $AgNO_3 + HNO_3$  einen Niederschlag gab; das Gemisch wurde filtrirt, das Filtrat wurde durch Thierkohle entfärbt und bei  $55-60^\circ$  bis zur Syrupconsistenz eingengt. Die erhaltene Lösung stand 7 Tage im Eisschrank, ohne zu krystallisiren. Nachher wurde diese Lösung mit Wasser verdünnt und derselben eine wässrige Lösung von Chlorbaryum, welche ungefähr 17 g des letzteren Salzes enthielt, zugesetzt und das Gemisch bis zur Syrupconsistenz eingengt. Beim Stehen bei Zimmertemperatur verwandelte sie sich vollkommen in eine krystallinische Masse. Der abgeschiedene, mit Filtrirpapier abgepresste Niederschlag hatte ein Gewicht von 20 g.

Derselbe wurde zweimal umkrystallisirt und zunächst im Vacuumexsiccator, alsdann bei  $100^{\circ}$  bis zum constanten Gewicht getrocknet; der Gehalt an Baryum betrug 24,50%.

0,9868 g Substanz gaben 0,2445 g  $\text{BaSO}_4$ .

Die freie gepaarte Säure krystallisirt nicht oder krystallisirt jedenfalls sehr langsam aus den ursprünglichen Lösungen, welche durch Zerlegung der Bleiessigniederschläge mit Schwefelsäure erhalten wurden, wie es der folgende Versuch zeigt.

Eine Menge ausgewaschenen Bleiessigniederschlags aus einem Antipyrinharn wurde rasch durch verdünnte Schwefelsäure zersetzt; das Gemisch wurde sofort filtrirt; das Filtrat mit Aetzbaryt neutralisirt und mit dem Niederschlage und Thierkohle eingeeengt. Die erhaltene eingeeengte Lösung wurde von  $\text{BaSO}_4$  und Kohle befreit und darauf bis zur Syrupconsistenz eingeeengt. Zu dieser eingeeengten Lösung wurde so lange verdünnte  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zugesetzt, als sich ein Niederschlag bildete. Die Lösung wurde durch Centrifugiren von dem Baryumsulfat abgeschieden und ungefähr einen Monat bei niedriger Temperatur im Exsiccator gehalten, wobei sich keine Spur von Krystallisation bemerkbar machte.

Die Darstellung der gepaarten Glycuronsäure aus dem Harn in Gestalt ihres Natron- resp. Kalisalzes, und zwar vermittelst heissen, verdünnten Alkohols erwies sich unbequem. Zu dem Zweck wurde der Antipyrinharn bei  $55\text{--}60^{\circ}$  fast bis zum Trocknen eingeeengt; der Rückstand wurde zunächst mit grossen Mengen 95%igen Alkohols ausgezogen, dann mit 75—80%igem Alkohol theilweise auf dem Wasserbade bei  $60\text{--}65^{\circ}$  unter öfterem Schütteln, theilweise durch Kochen auf dem Wasserbade in einem mit Rückflusskühler versehenen Kolben extrahirt. Sowohl das erste, durch 75—80%igen Alkohol bei  $60\text{--}65^{\circ}$  erhaltene Extract, als das durch Kochen gewonnene drehten die Ebene des polarisirten Lichtes nach links. Die Extracte wurden mit Thierkohle bei  $55\text{--}60^{\circ}$  eingedampft, das Gemisch wurde filtrirt und zunächst mit 95%igem Alkohol, alsdann mit Aether so lange vermischt, als sich ein Niederschlag bildete; letzterer wurde überhaupt nur in unbe-

sie ein unbedeutender Theil desselben aus.

Die freie Oxyantipyringlycuronsäure wird aus ihren wässrigen Lösungen weder durch Aether, noch durch Essigäther noch durch Amylalkohol extrahirt.

Die vorläufigen Versuche, welche die Spaltung dieser gepaarten Säure betrafen, erweisen, dass in dieselbe das Antipyrin als solches nicht eingeht. Die Spaltung wurde dermassen vorgenommen, dass eine wässrige Lösung des genannten Baryumdoppelsalzes mit Salzsäure bis zu 5% angesäuert in einem mit Rückflusskühler versehenen Kolben so lange auf dem Wasserbade gehalten wurde, bis eine maximale Rechtsdrehung der Lösung erhalten wurde. Alsdann wurde die abgekühlte Lösung mit Chloroform so lange geschüttelt, als das Chloroform noch etwas extrahirte. Die Chloroformextracte wurden vereinigt, das Chloroform entfernt und der Rückstand mit Wasser und Thierkohle gekocht. Das Filtrat wurde eingeeengt und mit Eisenchlorid, Millon's Reagens und Phosphorwolframsäure+Salzsäure geprüft. Alle diese Reactionen erwiesen sich gewöhnlich als sehr schwache.

Meine weiteren Untersuchungen sind unter anderem darauf hingerichtet, zu erforschen, welche Mengen des in den Organismus des Hundes eingeführten Antipyrins in Gestalt der genannten gepaarten Glycuronsäure ausgeschieden werden.

Zum Schluss halte ich es für eine angenehme Pflicht, meinen herzlichen Dank Herrn Geheimrath Prof. Dr. Max Jaffé, auf dessen Vorschlag und unter dessen liebenswürdiger Leitung diese Untersuchung vorgenommen worden ist, auszudrücken.

---

## **Zur Kenntniss des Thyreoglobulins.**

Von

Dr. med. et phil. **A. Oswald**, Privatdocent.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium der medicinischen Klinik in Zürich.)

(Der Redaction zugegangen am 16. Januar 1901.)

---

Wie ich in einer früheren, in dieser Zeitschrift veröffentlichten Abhandlung<sup>1)</sup> gezeigt habe, lassen sich aus der Schilddrüse zwei Eiweisskörper gewinnen, deren einer jodhaltig, der andere dagegen jodfrei, dafür aber phosphorhaltig ist. Der jodhaltige Körper, der die äusseren Eigenschaften eines Globulins trägt und deshalb Thyreoglobulin bezeichnet wurde, ist der Träger der specifischen Wirksamkeit der Schilddrüse. Dem Organismus einverleibt, bewirkt er eine Mehrausscheidung der stickstoffhaltigen Stoffe durch die Niere, beim Myxödemkranken bringt er die pathologischen Zustände zum Schwinden, und wie erst kürzlich E. von Cyon und ich beim Hunde und Kaninchen nachgewiesen haben,<sup>2)</sup> besitzt er auch die eigenartige Wirkung des Jodothyrens auf den Blutdruck und die Pulsfrequenz.

Das Thyreoglobulin enthält sämmtliches in der Schilddrüse vorkommende Jod in organischer Bindung, und aus ihm lässt sich durch Spaltung der jodhaltige Complex gewinnen, den Baumann als Jodothyren bezeichnet hat.

Meine Versuche hatte ich an Schilddrüsen von Schweinen ausgeführt. Der Körper, den ich aus diesen Drüsen erhalten hatte, besass stets, selbst nach zwei verschiedenen Methoden dargestellt, die gleiche Zusammensetzung. Daraus durfte ent-

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 15, 1899.

<sup>2)</sup> Pflüger's Archiv f. die gesammte Physiol., Bd. 83, S. 199.

physiologisches Produkt der Thyreoidea darstelle.

Die Feststellung, dass das aus Schilddrüsen anderer Thierarten gewonnene Thyreoglobulin die gleiche Zusammensetzung oder wenigstens bei einer und derselben Species stets dieselbe procentarische Zusammensetzung besitze, war im höchsten Maasse geeignet, diese Anschauung zu bekräftigen. Sie war daher für die Beurtheilung der Function der Schilddrüse von grösster Bedeutung. Ich habe es demzufolge unternommen, meine Untersuchungen auch auf die Thyreoidea anderer Thiergattungen und auf die des Menschen auszudehnen.

Schilddrüsen konnte ich in genügender Menge nur vom Schaf, Rind und Kalb erhalten, dafür war ich aber in der Lage, mir vom Menschen, ausser normalen Drüsen auch ausgesprochene Strumen in reichlicher Menge zu verschaffen. Die Untersuchung dieser letzteren schien mir ganz besonders geeignet, unter Umständen neue Anhaltspunkte zum Verständniss des Kropfes zu liefern. Es war von besonderer Wichtigkeit, zu erfahren, wie sich das in pathologisch veränderten Drüsen vorhandene Thyreoglobulin zu dem der normalen Drüsen verhält.

Ich habe früher gezeigt,<sup>1)</sup> dass die colloidreichen Strumen, im Vergleich zur normalen Thyreoidea, viel mehr Jod enthalten, ferner, dass ein gewisser Parallelismus zwischen dem Colloidreichthum und dem Jodgehalt der Drüsen besteht. Das Colloid erwies sich seinerseits als der Hauptmenge nach aus Thyreoglobulin bestehend. Es blieb daher noch übrig, zu ermitteln, ob das Thyreoglobulin der normalen Drüsen eine andere Zusammensetzung habe, als das der Strumen, oder ob dieselbe in beiden Fällen die gleiche sei, der höhere Jodgehalt der Strumen also bloss auf dem Vorhandensein einer grösseren Menge von Thyreoglobulin beruhe.

Das Thyreoglobulin wurde aus den Schilddrüsen nach dem früher schon geschilderten Verfahren<sup>2)</sup> durch Halbsättigung

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 265, 1897.

2) ibid., Bd. XXVII, S. 27.

des wässerigen Drüsenextractes mit Ammoniumsulfat gewonnen. Der Niederschlag wurde zum Zwecke der Reinigung verschiedene Male in Wasser gelöst und mit Ammoniumsulfat wieder ausgefällt. Zum Schluss wurde aus der wässerigen Lösung der Eiweisskörper entweder direkt mit Essigsäure gefällt und die Fällung auf dem Filter mit schwach angesäuertem Wasser salzfrei gewaschen; oder die wässerige Lösung wurde durch Dialyse salzfrei gemacht und der Eiweisskörper mit der vierfachen Menge Alkohol von 90% gefällt.

Der Niederschlag stellte in beiden Fällen schneeweisse Flocken dar.

Die aus den Drüsen der verschiedenen Thierspecies und des Menschen erhaltenen Produkte besaßen die gleichen chemischen und physikalischen Eigenschaften, welche mit den schon früher geschilderten<sup>1)</sup> übereinstimmten.

Die Coagulationstemperatur betrug beim Thyreoglobulin des Hammels, Ochsen und Kalbes in einer 10% Magnesiumsulfat enthaltenden Lösung 67° C.; beim Schwein hatte ich unter denselben Bedingungen 65° bis 66° C. gefunden. Auch die Zusammensetzung war die gleiche; bloss der Jodgehalt war bei den verschiedenen Thyreoglobulinen Schwankungen unterworfen, auf die wir alsbald zu sprechen kommen werden.

Die Präparate wurden zuerst bei 80°, dann bei 110° und 120° C. bis zur Gewichtsconstanz getrocknet und der Elementaranalyse unterzogen.

Es wurden von den verschiedenen Thierspecies mehrere Präparate angefertigt, da es mir besonders darauf ankam, festzustellen, ob etwa bei derselben Thiergattung Schwankungen in der Zusammensetzung, vorzugsweise im Jodgehalt, vorkämen.

Bevor ich die Resultate der Analysen mittheile, muss ich noch Einiges über das zur Bestimmung des Jods angewendete Verfahren erwähnen.

Anfänglich hatte ich, wie auch schon früher, das Jod entweder nach Carius oder durch Schmelzen im Nickeltiegel in Gegenwart von überschüssigem Aetznatron, Aufnehmen der

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVI, S. 28.

sauerten Lösung mit Silbernitrat und Wägen des Silberniederschlags bestimmt. Es fiel mir jedoch im Verlauf der Untersuchungen auf, dass der erhaltene Silberniederschlag nicht immer das gelbe Aussehen des Jodsilbers hatte, sondern nach kurzer Zeit schmutzig grau wurde. Der Verdacht auf das Vorhandensein von Chlorsilber war somit gegeben. In der That wird nach diesem Verfahren, falls in der Asche des Eiweisskörpers Chlor vorhanden ist, dasselbe mitgefällt und dadurch ein zu hoher Jodgehalt vorgetäuscht.

Meine früheren Angaben über den Jodgehalt des Thyreoglobulins des Schweines,<sup>1)</sup> zu dessen Bestimmung ich mich der Fällung mit Silber bedient hatte, müssen daher auch, wie wir gleich sehen werden, dementsprechend richtig gestellt werden.

In der Folge habe ich das Jod mit Hülfe einer von Fresenius<sup>2)</sup> empfohlenen Methode bestimmt, welche die vollständige Trennung des Jods vom Chlor ermöglicht. Ich bin dabei folgendermaassen vorgegangen:

Das Thyreoglobulin wird im Nickeltiegel, in Gegenwart von Wasser, mit reinem Aetznatron über freier Flamme so lange erhitzt, bis die Lösung eingedampft ist; darauf Salpeter zugefügt und vollständig verascht. Alsdann wird die erkaltete Schmelze in Wasser aufgenommen, die Lösung in eine Flasche mit eingeriebenem Glasstopfen filtrirt, dazu etwa 10 ccm. Schwefelkohlenstoff gefügt und darauf mit Schwefelsäure, in welche salpetrige Säure eingeleitet worden ist, angesäuert. Dann wird genau nach Fresenius' Vorschrift mit gereinigtem Schwefelkohlenstoff ausgeschüttelt und letzterer wiederholt mit Wasser gewaschen. (Vergl. Fresenius loc. cit.). Zu dem in Schwefelkohlenstoff gelösten Jod werden 30 ccm. einer 0,5%igen Auflösung von doppeltkohlensaurem Natron

---

1) Vergl. Zeitschr. f. physiol. Chemie, B. XXVII und ferner betreffs des Jodgehalts des Thyreoglobulins des Hammels, des Ochsen und des Menschen: Verhandlg. der Gesell. deutsch. Naturf. und Aerzte, 71. Versammlg. 1899, II. Theil, II. Hälfte, S. 491.

2) Anleitung. z. quant. chem. Analyse, 6. Aufl., Bd. I, S. 482.

gebracht und aus einer Burette, unter geeignetem Umschütten, so lange von einer sehr verdünnten Lösung von unterschwefeligsauerm Natron, deren Titer mit Hülfe einer Jodkaliumlösung von bekanntem Gehalt vorher festgestellt worden ist, zufließen gelassen, bis der Schwefelkohlenstoff eben vollständig entfärbt ist. Aus der Menge der verbrauchten Cubikcentimeter lässt sich der Jodgehalt berechnen.

Diese ausgezeichnete Methode, welche übrigens den Vortheil hat, wenig Zeit zu fordern, liefert, wie ich mich mit Hülfe von Präparaten von bekanntem Jodgehalt überzeugt habe, ganz genaue Resultate.

Noch einfacher und ebenso genau, falls es sich um die Bestimmung kleiner Mengen Jod handelt, ist das colorimetrische Verfahren nach Rabourdin, dessen ich mich früher schon bedient hatte, von welchem ich aber eine Zeit lang abgekommen war, um den mit Unrecht gegen dieses Verfahren erhobenen Einwänden zu entgehen. Nachdem ich mich aber wiederum überzeugt hatte, dass durch diese einfache Methode die gleichen Resultate erhalten werden, wie mit dem soeben geschilderten Verfahren, so habe ich dieselbe wieder in Anwendung gebracht.

Uebrigens lassen sich auch diese beiden Methoden mit Leichtigkeit vereinigen. Es genügt dazu, anstatt Chloroform eine abgemessene Menge Schwefelkohlenstoff zu verwenden und den Jodgehalt zuerst colorimetrisch und nachher mittelst der Natriumthiosulfatlösung zu bestimmen.

Um mit dem colorimetrischen Verfahren genaue Resultate zu erzielen, ist es erforderlich, dass im Verhältniss zu der zu bestimmenden Jodmenge nicht zu wenig Schwefelkohlenstoff verwendet wird, da sonst die intensive Färbung der Lösung feinere Unterschiede wahrzunehmen nicht mehr gestattet. Es dürfen höchstens 0,8 mg Jod auf 10 ccm. Schwefelkohlenstoff kommen; bei grösseren Mengen Jod soll deshalb entsprechend mehr Schwefelkohlenstoff gebraucht werden.

Chlor wurde in der Art bestimmt, dass dessen Menge berechnet wurde aus dem mit Hülfe einer der beiden ange-



mit Silbernitrat erhaltenen gesammten Halogenmenge.

Das Chlor wurde aber auch direkt neben Jod bestimmt, indem der nach dem Veraschen mit Aetznatron und Salpeter auf Zusatz von Silbernitrat erhaltene Halogensilberniederschlag mit einem Gemenge von 7 Theilen Wasser, 1 Theil concentrirtem Ammoniak und 1 Theil Alkohol<sup>1)</sup> in der Kälte digerirt wurde. Das unlösliche Jodsilber wurde alsdann abfiltrirt, mit demselben Gemenge ausgewaschen, getrocknet und gewogen. Aus dem Filtrat und Waschwasser wurde das in Lösung gegangene Chlorsilber durch Ansäuern mit Salpetersäure wieder ausgefällt und in der üblichen Weise zur Wägung gebracht.

Ich lasse nunmehr die analytischen Daten folgen:

### Thyreoglobulin des Hammels.<sup>2)</sup>

#### Präparat I.

0,2397 g Substanz gaben beim Verbrennen im offenen Rohr 0,4569 g  $\text{CO}_2$  = 0,1246 C = 51,98 % C, und 0,1516 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,0168 H = 6,98 % H.

0,2295 g Substanz lieferten 0,0441 g  $\text{NH}_3$ <sup>3)</sup> = 0,0363 N = 15,80 % N.

0,5462 g Substanz gaben beim Schmelzen im Nickeltiegel (beim Titriren mit n/100 Thiosulfatlösung und nach dem colorimetrischen Verfahren) 0,00277 g J = 0,50 % J.

0,6546 g Substanz gaben beim Schmelzen im Nickeltiegel (nach dem Trennungsvorverfahren mit verdünntem Alkohol) 0,00685 g AgJ = 0,0037 J = 0,56 % J, und 0,00435 g AgCl = 0,00106 g Cl = 0,16 % Cl.

Im Mittel: 0,53 % J.

#### Präparat II.

0,3910 g Substanz gaben beim Schmelzen im Nickeltiegel und Titriren mit Thiosulfatlösung 0,002079 g J = 0,33 % J.

#### Präparat III.

0,3910 g Substanz gaben nach demselben Verfahren 0,001078 g J = 0,27 % J.

1) In verdünntem Ammoniak ist, entgegen den Behauptungen der Lehrbücher, Jodsilber in geringer Menge löslich. Der Zusatz von Alkohol von 90 % hebt diese Löslichkeit auf.

2) Die Schilddrüsen vom Hammel und Ochsen stammten aus Zürich und waren vorwiegend von normaler Grösse und Beschaffenheit.

3) Die Stickstoffbestimmungen wurden alle nach Kjeldahl ausgeführt.

0,5262 g Substanz gaben 0,001386 g J = 0,26 % J.

#### Präparat V.

0,4519 g Substanz gaben 0,002002 g J = 0,44 % J.

#### Präparat I.

0,7900 g Substanz gaben 0,00218 g AgCl = 0,00053 Cl = 0,06 % Cl.

0,7366 g Substanz gaben 0,1035 g BaSO<sub>4</sub> = 0,0142 g S = 1,92 % S.

0,8284 g Substanz gaben 0,1183 g BaSO<sub>4</sub> = 0,0162 g S = 1,96 % S.

Im Mittel: 1,94 % S.

0,2575 g Substanz gaben 0,0017 g Asche = 0,66 % Asche.

0,2446 g Substanz gaben 0,0016 g Asche = 0,65 % Asche.

Im Mittel: 0,65 % Asche.

Aus dem Mittel der Procentwerthe ergeben sich, auf die aschefreie Substanz berechnet, folgende Zahlen:

C 52,32,

H 7,02,

N 15,90,

J<sup>1)</sup> 0,39,

S 1,95.

#### Thyreoglobulin des Ochsen.

0,2610 g Substanz gaben beim Verbrennen 0,49975 g CO<sub>2</sub> = 0,1363 C = 52,22 % C, und 0,1662 g H<sub>2</sub>O = 0,180 H = 6,90 % H.

0,1969 g Substanz gaben 0,0471 g NH<sub>3</sub> = 0,0388 N = 15,85 % N.

0,4617 g Substanz gaben (durch Titiren mit Thiosulfatlösung und colorimetrisch) 0,004312 g J = 0,93 % J.

0,6939 g Substanz gaben 0,01205 g AgJ = 0,0065 J = 0,93 % J und Spuren von Cl.

0,7182 g Substanz gaben 0,00905 g AgJ = 0,00529 J = 0,73 % J und Spuren von Cl.

Im Mittel: 0,86 % J.

0,6939 g Substanz gaben 0,09345 g BaSO<sub>4</sub> = 0,01283 g S = 1,84 % S.

0,7182 g Substanz gaben 0,09555 g BaSO<sub>4</sub> = 0,01312 g S = 1,82 % S.

Im Mittel: 1,83 % S.

0,2420 g Substanz gaben 0,0010 g Asche = 0,45 % Asche.

---

1) Das Chlor wurde hier sowie bei den folgenden Analysen weggelassen, da wir annehmen dürfen, dass es aus dem Chloralkali der Asche stammt.

folgende:

C	52,45,
H	6,93,
N	15,92,
J	0,86,
S	1,83.

#### Thyreoglobulin des Kalbes.

Das Thyreoglobulin des Kalbes wurde aus Schilddrüsen, die aus Zürich, und solchen, die aus Paris stammten, gewonnen. Die ersteren waren sämmtlich mehr oder weniger strumös entartet, zum Theil von ungewöhnlich grossem Umfang, die letzteren dagegen von normaler Grösse und Beschaffenheit.

Die Untersuchung des Thyreoglobulins dieser verschiedenen Provenienz hat, wie wir bald sehen werden, zu wichtigen Befunden geführt.

#### Thyreoglobulin des Kalbes aus Zürich.

##### Präparat I.

0,23665 g Substanz gaben 0,4569 g  $\text{CO}_2 = 0,1246 \text{ g C} = 52,63 \%$  C,  
und 0,1495 g  $\text{H}_2\text{O} = 0,0166 \text{ g H} = 7,01 \%$  H.

0,2516 g Substanz gaben 0,0483 g  $\text{NH}_3 = 0,0398 \text{ g N} = 15,85 \%$  N.

0,1972 g Substanz gaben 0,0383 g  $\text{NH}_3 = 0,0316 \text{ g N} = 16,04 \%$  N.

Im Mittel: 15,94 % N.

J = 0.

##### Präparat II.

J = 0.

##### Präparat III.

J = 0.

##### Präparat I.

0,5958 g Substanz gaben 0,01645 g  $\text{AgCl} = 0,00402 \text{ g Cl} = 0,67 \%$  Cl.

0,5030 g Substanz gaben 0,01245 g  $\text{AgCl} = 0,00304 \text{ g Cl} = 0,60 \%$  Cl.

Im Mittel: 0,63 % Cl.

0,5958 g Substanz gaben 0,0869 g  $\text{BaSO}_4 = 0,01194 \text{ g S} = 2,00 \%$  S.

0,2315 g Substanz gaben 0,0008 g Asche = 0,34 % Asche.

0,26375 g Substanz gaben 0,00085 g Asche = 0,32 % Asche.

Im Mittel: 0,33 % Asche.

folgende:

C	52,80,
H	7,04,
N	15,99,
J	0,0
S	2,00.

### Thyreoglobulin des Kalbes aus Paris.

Es wurden verschiedene Präparate angefertigt.

#### Präparat I.

0,2385 g Substanz gaben 0,001232 g J = 0,51 % J.

#### Präparat II.

0,3470 g Substanz gaben 0,001848 g J = 0,53 % J.

#### Präparat III.

0,2160 g Substanz gaben 0,001386 g J = 0,64 % J.

Im Mittel: 0,56 % J.

Der Uebersicht halber mögen die vier untersuchten Thyreoglobuline neben einander gestellt werden.

### Thyreoglobulin

	des Schweins,	des Hammels,	des Ochsen,	des Kalbs	
				aus Kripton	aus normalen Drüsen.
C	52,21	52,32	52,45	52,80	—
H	6,83	7,02	6,93	7,04	—
N	16,59	15,90	15,92	15,99	—
J	0,46 <sup>1)</sup>	0,39	0,86	0	0,56
S	1,86	1,95	1,83	2,00	—
(O)	(22,15)	(22,42)	(22,01)	(21,61)	—

Aus den eben angeführten Analysen geht hervor:  
dass ein Eiweisskörper von den Eigenschaften des früher schon näher studirten Thyreoglobulins, aus Schilddrüsen vom

<sup>1)</sup> Der früher angegebene Jodgehalt des Thyreoglobulins des Schweins (1,66 %) ist aus den schon erwähnten Gründen zu hoch. Er beträgt, wie ich mich nachträglich an den von meinen früheren Untersuchungen übrig gebliebenen Präparaten überzeugt habe, bloss 0,46 %.

nachweisen lässt, somit einen charakteristischen Bestandtheil der normalen Schilddrüse bildet;

ferner, dass das Thyreoglobulin bei einer und derselben Thierart (vergl. Ochs und Kalb), vom Jod abgesehen, die gleiche Zusammensetzung hat;

schliesslich, dass die Zusammensetzung des Thyreoglobulins sogar bei den verschiedenen untersuchten Säugern, wiederum vom Jod abgesehen, annähernd die gleiche ist.

Beim Vergleich der analytischen Werthe fällt es aber auf, dass der Jodgehalt von einer Thiergattung zur anderen verschieden ist — beim Schwein 0,46%, beim Hammel 0,39%, beim Ochsen 0,86% —, und dass er sogar, was wichtiger ist, bei einer und derselben Thierart zwischen Null (Kalb) und 0,86% (Rind) schwanken kann.

Die Untersuchungen über das Thyreoglobulin aus Kalbsdrüsen aus Zürich erstrecken sich auf etwa 50 verschiedene Schilddrüsen, die somit alle jodfrei waren, d. h. ein jodfreies Thyreoglobulin enthielten.

Die Thatsache, dass das Thyreoglobulin der Kälber kein Jod enthält, ist von besonderer Bedeutung; sie stimmt mit den Angaben verschiedener Autoren überein,<sup>1)</sup> welche die Schilddrüsen neugeborener oder junger Menschen und Thiere jodfrei oder nahezu jodfrei gefunden haben.

Das gänzliche Fehlen des Jods im Thyreoglobulin der Kälber kann darin seine Erklärung finden, dass die Thiere, die von Muttermilch leben, kein Jod zu sich nehmen, was mit der allgemein gültigen Ansicht, dass das Jod mit der Nahrung in den Organismus gelange, im Einklang steht. Damit ist aber nicht erklärt, warum in dem Thyreoglobulin der Pariser Kälber Jod in ziemlich beträchtlicher Menge (0,56%, als Mittel aus 3 aus verschiedenen Drüsen gewonnenen Präparaten) gefunden wurde, man müsste denn annehmen, dass

---

<sup>1)</sup> Baumann, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXII, S. 11. Weiss, Münch. Med. Wochenschr. 1897, S. 6. Meine früheren Beobachtungen, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIII, S. 291.

diese Kälber schon andere Nahrung als Muttermilch zu sich genommen hatten. Diesbezügliche Nachforschungen machten aber letzteres nicht wahrscheinlich.

Der Grund, warum das eine Mal Jod gänzlich mangelt, das andere bis zu 0,56% vorkommt, ist anderswo zu suchen.

Ich machte schon darauf aufmerksam, dass die Schilddrüsen aus Zürich sämtlich strumös entartet, d. h. beträchtlich vergrössert waren. Die kleinsten wogen 60—70 g, die mittleren erheblich mehr, bis 150 g, einzelne aber erreichten das hohe Gewicht von beinahe 300 g,<sup>1)</sup> während die gleichen Drüsen aus Paris viel kleiner waren und bloss 15—20 g oder noch weniger wogen.

Ferner waren die Kröpfe der Züricher Kälber, worauf besonders Gewicht gelegt werden möge, nicht Colloidkröpfe, sondern Strumen einfach hypertrophischer Art. Colloid war darin überhaupt nicht zu sehen. Die Pariser Drüsen dagegen liessen, wie das bei normalen Drüsen der Fall zu sein pflegt, deutliche Colloidkügelchen erkennen.

Die Erfahrung, dass einerseits sämtliche Drüsen aus Zürich sogenannte hypertrophische oder hyperplastische Strumen waren, kein Colloid erkennen liessen und jodfreies Thyreoglobulin in sich bargen, kann wohl nicht auf Zufall beruhen, da sie sich auf zahlreiche, etwa 100 Schilddrüsen erstreckt. In welchem Zusammenhange diese Verhältnisse zu einander stehen, und wie sie zu deuten sind, soll weiter unten besprochen werden.

Dass gerade das Auftreten des Colloids mit dem Jodgehalt der Schilddrüse oder, richtiger gesagt, des Thyreoglobulins in Zusammenhang steht, und dass der Jodgehalt der Drüsen nicht allein von deren Grösse, sondern vom Gehalt an Colloid abhängt, steht im Einklang mit meinen früheren ausgedehnten Untersuchungen über diesen Gegenstand.<sup>2)</sup> Ein Beispiel mag hier besonders hervorgehoben werden.

---

1) Sämtliche hier erwähnten Gewichte beziehen sich auf frische Drüsen.

2) Vergl. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIII, S. 265.



hohen Gewichtes nur minimale Jodmengen, 0,8 mg, oder selbst nur Spuren davon, während viel weniger umfangreiche, colloidreiche Drüsen mit einem 5 mal geringeren Gewicht von 2,5, 2,7 und 2,1 g (= frisch ca. 10 g), 7,7, 4,15 bzw. 4,3 mg Jod enthielten.

Ob man den jodfreien Eiweisskörper, der aus den Züricher Kalbsschilddrüsen gewonnen wurde, überhaupt als eigentliches Thyreoglobulin bezeichnen darf, ist fraglich. Denn es hat sich bei der Prüfung seiner physiologischen Eigenschaften, im Gegensatz zu dem jodhaltigen Thyreoglobulin, als gänzlich wirkungslos, sowohl auf Blutdruck als auf Pulsfrequenz erwiesen.<sup>1)</sup>

Dieser letzte Befund legt uns bezüglich der Natur der erhaltenen Eiweisskörper zwei Möglichkeiten vor. Entweder stellt der jodfreie Eiweisskörper, der, abgesehen vom Jod, die Zusammensetzung des Thyreoglobulins hat, die eine Componente dar, aus welcher durch Addition von Jod oder Substitution mit Jod das Thyreoglobulin, d. h. der physiologisch wirksame Körper hervorgeht. Daraus würde folgen, dass die Wirksamkeit des Thyreoglobulins von dem Vorhandensein von Jod abhängig ist — und zwar ist hier auch die Bindung an der bestimmten noch unbekannten Stelle innerhalb des Eiweissmoleküls, wie sie durch die Jodirung *intra corpus* stattfindet, massgebend, da das künstliche *in vitro* jodirte Eiweiss die eigenartige Wirksamkeit des Thyreoglobulins nicht besitzt. Oder aber dieser jodfreie Eiweisskörper stellt überhaupt kein Thyreoglobulin dar, sondern ist ein Eiweisskörper, der auch normaler Weise in der Drüse vorkommt, der aber mit dem Thyreoglobulin gefällt wird, weil er bei der gleichen Salzconcentration, wie das Thyreoglobulin, ausfällt. In diesem Falle wäre es aber auffallend, dass dieser Eiweisskörper gerade auch, wie das Thyreoglobulin, durch Zusatz verdünnter Säuren aus seiner wässerigen Lösung gefällt würde, eine Eigenschaft, die andere Globuline wie z. B. das Serumglobulin nicht haben, und dass er die gleiche Gerinnungstemperatur wie das Thyreoglobulin besässe.

<sup>1)</sup> v. Cyon u. Oswald. Pflüger's Arch. f. d. gesammte Physiol., Bd. 83, S. 202.

Wäre dem so, dann würde der bisher als Thyreoglobulin bezeichnete Körper ein Gemenge von dem eigentlichen jodhaltigen Thyreoglobulin und von dem jodfreien Eiweisskörper sein, und eine geeignete Trennungsmethode beider Körper wäre noch zu finden. Dabei ist aber zu bemerken, dass dieser jodfreie Eiweisskörper dieselbe elementare Zusammensetzung haben müsste, wie der jodhaltige, da das jodfreie Präparat aus den strumösen Kalbsdrüsen den gleichen Kohlenstoff-, Wasserstoff und Stickstoffgehalt besitzt wie der jodhaltige aus den Ochsendrüsen. Es ist daher eher anzunehmen, dass beide Präparate den gleichen Körper darstellen, der in dem einen Falle jodirt, in dem anderen nicht jodirt ist. Auf diese letzte Erscheinung, welche das für die Function der Schilddrüse eigentlich Charakteristische darzustellen scheint, werden wir später, nachdem wir die Verhältnisse bei den menschlichen Schilddrüsen werden kennen gelernt haben, zu sprechen kommen.

An dieser Stelle möchte ich erwähnen, dass Blum<sup>1)</sup> schon darauf aufmerksam gemacht hat, dass der Jodgehalt des Thyreoglobulins ein schwankender sein kann. Die Untersuchungen von Blum waren aber für mich insofern belanglos, als dieser Autor das Jod nach der Methode von Carius bestimmt hatte, die, wie ich schon bemerkt habe, in diesem Falle keine brauchbaren Resultate liefert, da das Chlor der Asche mit dem Jod zusammen in Rechnung kommt. Schwankungen im Aschegehalt mussten daher Schwankungen im Jodgehalt vortäuschen.<sup>2)</sup>

---

1) Pflüger's Archiv f. d. ges. Physiol., Bd. 77, S. 70.

2) Dazu kommt, dass kleine Schwankungen im Jodgehalt, wie überhaupt in der Zusammensetzung des Thyreoglobulins, ihren Grund in dem verschiedenen Blutgehalt der verarbeiteten Drüsen haben können. Bei Halbsättigung des wässerigen Drüsenextractes mit Ammoniumsulfat wird ja auch das Serumglobulin gefällt; ist eine Drüse sehr blutreich und vor der Verarbeitung nicht gründlich mit Wasser ausgewaschen worden, so wird das erhaltene Produkt, in Folge der Beimengung von Serumglobulin, einen entsprechend geringeren Jodgehalt besitzen.

Die Drüsen können, so weit überhaupt möglich, leicht von ihrem Blut befreit werden, wenn man sie vor der Zerkleinerung 1–2 Tage im Eisschrank in Wasser, unter Zusatz von Toluol, liegen lässt und dasselbe so oft erneuert, bis es sich nicht mehr roth färbt.



Beiläufig sei auch erwähnt, dass ich der Behauptung Blum's, man fände in den verschiedenen Thyreoglobulinpräparaten, die durch wiederholte Extraction der gleichen Schilddrüsen mit Wasser erhalten werden, einen verschiedenen Jodgehalt, nicht beistimmen kann. Ich habe auf diese angebliche Erscheinung geachtet, aber allemal die gleichen Jodwerthe gefunden. Die Präparate II, III und IV des Thyreoglobulins vom Hammel, welche durch auf einander folgende Extraction der gleichen Schilddrüsen erhalten wurden, stimmen mit ihrem respectiven Jodgehalt von 0,33, 0,27 und 0,26% sehr gut mit einander überein.

---

#### **Thyreoglobulin des Menschen.**

Im Weiteren habe ich Schilddrüsen vom Menschen untersucht, und zwar, wie Eingangs erwähnt, sowohl normale als auch pathologisch veränderte Drüsen, ferner Drüsen von Kindern.

Zu diesen Untersuchungen standen mir nur Colloidkröpfe zur Verfügung. Strumen einfach hypertrophischer Art konnte ich mir bisher nicht verschaffen.

Um einerseits sicher zu sein, normale Schilddrüsen vom Menschen in Händen zu haben, wurden solche in Bearbeitung genommen, die aus einer Gegend stammten, in welcher keine Kropfendemie herrscht. Es wurde mir zu diesem Zweck in freundlichster Weise vom Prosector des pathologisch-anatomischen Instituts des Krankenhauses in Hamburg-Eppendorf, H. Dr. Fränkel, eine grössere Anzahl Schilddrüsen übersandt. Es ist mir eine angenehme Pflicht, auch an dieser Stelle Herrn Dr. Fränkel meinen wärmsten Dank für sein bereitwilliges Entgegenkommen und die mir dadurch gewährte Unterstützung auszusprechen.

Andererseits wurden Colloidstrumen aus Basel und aus Zürich verarbeitet, beides Städte, wo der Kropf endemisch vorkommt.

Da sich unter den mir zugeschickten Schilddrüsen aus Hamburg auch einige befanden, welche im Verhältniss zu den

übrigen Hamburger Drüsen colloidreicher und vergrößert waren (sie erreichten ein Gewicht von 70—80 und 90 g, während normale Drüsen bloss 30—50 g wiegen,<sup>1)</sup> so wurden dieselben von den übrigen getrennt und besonders untersucht.

Die Gewinnung des Thyreoglobulins erfolgte nach dem schon beschriebenen Verfahren. Es stellte sich dabei nichts Besonderes heraus, auch das Aussehen des aus Strumen gewonnenen Thyreoglobulins zeigte nichts Auffälliges. Die allgemeinen chemischen Eigenschaften der Körper waren die gleichen wie die des Thyreoglobulins aus den Schilddrüsen von Thieren.

Der Coagulationspunkt lag in einer 10% Magnesiumsulfat enthaltenden Lösung bei 71,0° C.

Die durch Dialyse vom Ammonsulfat befreiten Thyreoglobulinlösungen wurden mit Alkohol von 90% versetzt und das in Flocken ausgeschiedene Thyreoglobulin abfiltrirt, getrocknet und der Elementaranalyse unterworfen.

Es mögen die analytischen Daten folgen:

**Thyreoglobulin aus Colloidstrumen des Menschen aus Basel.**

0,2332 g Substanz gaben 0,4433 g CO<sub>2</sub> = 0,1209 g C = 51,84% C,  
und 0,1447 g H<sub>2</sub>O = 0,0160 g H = 6,89% H.

0,2831 g Substanz gaben 0,0625 g NH<sub>3</sub> = 0,0433 g N = 15,31% N.

0,4908 g Substanz gaben<sup>2)</sup> 0,00046 g J = 0,09% J.

0,5484 g Substanz gaben 0,000308 g J = 0,05% J.

Im Mittel: 0,07% J.

0,5992 g Substanz gaben 0,00657 g AgCl = 0,00159 g Cl = 0,26% Cl.

1,5652 g Substanz gaben 0,01348 g AgCl = 0,00326 g Cl = 0,20% Cl.

Im Mittel: 0,23% Cl.

0,6132 g Substanz gaben 0,0906 g BaSO<sub>4</sub> = 0,01244 g S = 2,02% S.

1,5652 g Substanz gaben 0,21095 g BaSO<sub>4</sub> = 0,02895 g S = 1,84% S.

Im Mittel: 1,93% S.

0,3016 g Substanz gaben 0,0011 g Asche = 0,36% Asche.

0,3053 g Substanz gaben 0,0011 g Asche = 0,36% Asche.

Im Mittel: 0,36% Asche.

---

<sup>1)</sup> Vergleiche meine früheren Auseinandersetzungen. Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIII, S. 270.

<sup>2)</sup> Da, wo nichts Weiteres bemerkt ist, wurde das Jod nach dem Titirverfahren mit Thiosulfatlösung bestimmt.

H	6,91
N	15,32
J	0,07
S	1,93

### Thyreoglobulin aus Colloidstrumen des Menschen aus Zürich.

0,2268 g Substanz gaben 0,4283  $\text{CO}_2$  g = 0,1168 g C = 51,50 % C;  
und 0,1364 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,0151 g H = 6,68 % H.

0,2103 g Substanz gaben 0,3969 g  $\text{CO}_2$  = 0,1082 g C = 51,47 % C.  
Im Mittel: 51,48 % C und 6,68 % H.

0,2748 g Substanz gaben 0,0524 g  $\text{NH}_3$  = 0,0432 g N = 15,01 % N.  
0,5361 g Substanz gaben 0,0009 g J = 0,17 % J.

0,5243 g Substanz gaben 0,0012012 g J = 0,22 % J.  
Im Mittel: 0,19 % J.

0,6582 g Substanz gaben 0,01094 g AgCl = 0,00265 g Cl = 0,40 % Cl.  
0,7155 g Substanz gaben 0,00753 g AgCl = 0,00183 g Cl = 0,25 % Cl.  
Im Mittel: 0,32 % Cl.

0,6582 g Substanz gaben 0,09105 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,0125 g S = 1,89 % S.  
0,7155 g Substanz gaben 0,10195 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,0140 g S = 1,95 % S.  
Im Mittel: 1,92 % S.

0,2530 g Substanz gaben 0,0014 g Asche = 0,55 % Asche.  
0,2626 g Substanz gaben 0,0015 g Asche = 0,57 % Asche.  
Im Mittel: 0,56 % Asche.

Auf aschefreie Substanz berechnet:

C	51,77,
H	6,71,
N	15,09,
J	0,19,
S	1,93.

### Thyreoglobulin aus normalen Schilddrüsen des Menschen aus Hamburg.

0,2174 g Substanz gaben 0,4103 g  $\text{CO}_2$  = 0,1150 g C = 51,47 % C.  
0,2502 g Substanz gaben 0,1539 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,0171 g H = 6,83 % H.  
0,2873 g Substanz gaben 0,0536 g  $\text{NH}_3$  = 0,0442 g N = 15,41 % N.  
0,2497 g Substanz gaben 0,0479 g  $\text{NH}_3$  = 0,0383 g N = 15,35 % N.  
Im Mittel: 15,38 % N.

0,6601 g Substanz gaben 0,00231 g J = 0,35 % J.  
0,3600 g Substanz gaben 0,00123 g J = 0,34 % J.  
Im Mittel: 0,34 % J.

0,7239 g Substanz gaben 0,0114 g AgCl = 0,0027 g Cl = 0,37 % Cl.

1,3349 g Substanz gaben 0,0237 g AgCl = 0,0057 g Cl = 0,42 % Cl.

Im Mittel: 0,39 % Cl.

0,7239 g Substanz gaben 0,0964 g BaSO<sub>4</sub> = 0,01321 g S = 1,82 % S.

1,3349 g Substanz gaben 0,1860 g BaSO<sub>4</sub> = 0,02554 g S = 1,91 % S.

Im Mittel: 1,86 % S.

0,2640 g Substanz gaben 0,0020 g Asche = 0,75 % Asche.

0,2599 g Substanz gaben 0,0020 g Asche = 0,76 % Asche.

Im Mittel: 0,75 % Asche.

Auf aschefreie Substanz berechnet:

C 51,85,

H 6,88,

N 15,49,

J 0,34,

S 1,86.

#### Thyreoglobulin aus vergrößerten (colloidreichen) Schilddrüsen des Menschen aus Hamburg.

0,2292 g Substanz gaben 0,4322 g CO<sub>2</sub> = 0,1178 g C = 51,42 % C;  
und 0,1443 g H<sub>2</sub>O = 0,0160 g H = 7,00 % H.

0,2930 g Substanz gaben 0,0548 g NH<sub>3</sub> = 0,0452 g N = 15,43 % N.

0,2625 g Substanz gaben 0,0485 g NH<sub>3</sub> = 0,0400 g N = 15,25 % N.

Im Mittel: 15,34 % N.

0,2241 g Substanz gaben 0,0004235 g J = 0,19 % J.

0,6900 g Substanz gaben 0,0046 g AgCl = 0,0011 g Cl = 0,16 % Cl.

0,6728 g Substanz gaben 0,01037 g AgCl = 0,0025 g Cl = 0,37 % Cl.

Im Mittel: 0,26 % Cl.

0,6900 g Substanz gaben 0,0941 g BaSO<sub>4</sub> = 0,01277 g S = 1,85 % S.

0,6728 g Substanz gaben 0,08735 g BaSO<sub>4</sub> = 0,01199 g S = 1,78 % S.

Im Mittel: 1,81 % S.

0,2411 g Substanz gaben 0,0019 g Asche = 0,78 % Asche.

0,2444 g Substanz gaben 0,0019 g Asche = 0,78 % Asche.

Im Mittel: 0,78 % Asche.

Auf aschefreie Substanz berechnet:

C 51,82,

H 7,05,

N 15,46,

J 0,19,

S 1,83,

(Cl) (0,26).

Eine Struma, die von einer Basedowkranken herrührte, verdanke ich der hiesigen chirurgischen Klinik. Herrn Dr. M. O. Wyss, der die Freundlichkeit hatte, mir dieselbe zu übermitteln, möchte ich auch an dieser Stelle meinen besten Dank aussprechen.

Ich konnte aus dem exstirpirten Lappen so viel Thyreoglobulin darstellen, als ich für zwei Jodbestimmungen benötigte.

Die Gewinnung des Thyreoglobulins, sowie seine Eigenschaften boten nichts Besonderes. Es enthielt 0,07 % J.

0,3087 g Substanz gaben 0,000154 g J = 0,07 % J.

#### **Thyreoglobulin aus Schilddrüsen von Kindern aus Zürich.**

Eine grössere Anzahl von Schilddrüsen von Kindern erhielt ich durch Vermittelung meines Freundes Herrn Dr. R. v. Wyss, Arzt am hiesigen Kinderspital. Demselben sei auch an dieser Stelle mein Dank für seine mir dadurch gewährte Unterstützung ausgesprochen.

Die Drüsen stammten alle von Kindern unter 5 Jahren, bei welchen eine Behandlung mit Jod oder irgend einem Jodpräparate mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnte. Die Drüsen wurden in verschiedenen Portionen in der üblichen Weise verarbeitet und das Thyreoglobulin auf Jod untersucht.

Die Analysen ergaben Folgendes:

Präparat I, aus ca. 10 Drüsen:

0,3424 g Substanz enthielten 0,000616 g J = 0,18 % J.

Präparat II, aus ca. 15 Drüsen:

0,4790 g Substanz enthielten 0,000924 g J = 0,19 % J.

Im Durchschnitt: 0,18 % J.

#### **Thyreoglobulin eines Menschen, welcher Jodkalium eingenommen hatte.**

Um den Einfluss der künstlichen Jodzufuhr festzustellen, wurde aus der Schilddrüse eines Patienten der hiesigen Klinik, welcher in den drei letzten Wochen seines Lebens 22 g Jodkalium in der täglichen Dosis von 1 g per os zu sich ge-

nommen hatte, das Thyreoglobulin gewonnen. Dasselbe wurde in der üblichen Weise dargestellt. Die vergrößerte, etwa 80 g schwere Drüse war mit Colloid reichlich durchsetzt.

Es wurden durch mehrmalige Extraction zwei Präparate dargestellt. Dieselben wichen weder in ihren chemischen noch physikalischen Eigenschaften von denen anderer Menschen ab.

Die Prüfung auf den Jodgehalt ergab Folgendes:

Präparat I:

0,2515 g Substanz lieferten 0,001078 g J = 0,48 % J.

Präparat II:

0,1955 g Substanz lieferten 0,001078 g J = 0,55 % J.

Im Durchschnitt: 0,51 % J.

Der Uebersicht halber seien die Werthe der aus verschiedenen Gegenden aus normalen und pathologisch veränderten Drüsen gewonnenen Präparate vom Menschen nebeneinander gestellt:

### Thyreoglobulin vom Menschen

	aus Colloidkröpfen		aus dem Kropf einer Basedow-kranken	aus colloidreichen Drüsen aus Ham-burg	aus Schilddrüsen von Kindern aus Zürich	aus normalen Schilddrüsen aus Ham-burg	aus einem Colloidkropf aus Zürich, nach KJ-Zufuhr
	aus Basel	aus Zürich					
C	52,02	51,77	—	51,82	—	51,85	—
H	6,91	6,71	—	7,05	—	6,88	—
N	15,32	15,09	—	15,46	—	15,49	—
J	0,07	0,19	0,07	0,19	0,18	0,34	0,51
S	1,93	1,93	—	1,83	—	1,87	—
(O)	(23,75)	(24,31)	—	(23,65)	—	(23,57)	—

Aus den angeführten Beobachtungen und Analysen geht hervor, dass, wie die Schilddrüse der Thiere, so auch die des Menschen stets einen Eiweisskörper von den Eigenschaften des Thyreoglobulins enthält.

Die Zusammensetzung dieses Eiweisskörpers ist auch beim Menschen, der Jodgehalt ausgenommen, eine constante. Letzterer dagegen ist, wie beim Thier, ein variabler.

Bei näherer Prüfung des Jodgehaltes fällt auf, dass das Thyreoglobulin aus den Kröpfen jodärmer ist als das aus normalen Schilddrüsen, nämlich 0,07% (Basel), bzw. 0,19% (Zürich) gegenüber 0,34% (Hamburg).

Auch enthält das Thyreoglobulin aus den colloidreichen Drüsen aus Hamburg bloss etwa halb so viel Jod (0,19%) als das aus den normalen Drüsen aus Hamburg (0,34%).

Der relative Jodgehalt des Thyreoglobulins der colloidreichen Drüsen und Colloidstrumen ist also geringer, während der absolute Jodgehalt der ganzen Drüsen, wie früher schon gezeigt, ein höherer ist.

Nicht ohne Bedeutung ist auch der Befund, dass im Thyreoglobulin der Struma der Basedowkranken das Jod in derselben Menge vorhanden ist, wie in demjenigen der Colloidkröpfe, beispielsweise in dem der Kröpfe aus Basel.

Ferner sehen wir, dass das Thyreoglobulin der Schilddrüsen von Kindern aus Zürich, welche alle das fünfte Lebensjahr nicht überschritten hatten, die gleiche Menge Jod enthält, wie das der Strumen von Erwachsenen. Die Drüsen der Kinder waren entsprechend der herrschenden Kropfendemie zum grössten Theil hypertrophisch und colloidreich.

Die Analysen zeigen uns sodann, dass das Thyreoglobulin des mit Jodkalium behandelten Individuums, dessen vergrösserte Schilddrüse colloidreich war, über die doppelte Menge Jod enthält, als das der übrigen Menschen aus Zürich, und auch weit mehr, als das der normalen Drüsen aus Hamburg. Die Thatsache, dass die Schilddrüse nach Einführung von anorganischem Jod in den Körper einen höheren Jodgehalt aufweist, eine Erscheinung, auf welche schon mehrere Autoren aufmerksam gemacht haben, beruht also auf einem Mehrgehalt des Thyreoglobulins an Jod. Daraus müssen wir schliessen, dass das Thyreoglobulin die Fähigkeit hat, das dem Körper zugeführte Jod zum Theil zu binden. Diese letztere Erscheinung stellt etwas Merkwürdiges und für die Schilddrüse wohl Charakteristisches dar, das das Verständniss der Function dieses Organs nicht wenig erschwert.

Es ist überhaupt einstweilen noch schwierig, sich ein klares Bild über die chemischen Vorgänge in der Thyreoidea zu machen, denn wir sind noch weit davon entfernt, die dazu nothwendige experimentelle Grundlage zu besitzen. Will man daher die am Menschen und am Thier gemachten Beobachtungen in ein Schema zusammenfassen, so kann eine solche «Theorie» den Werth von Vermuthungen nicht überschreiten.

Vor Allem ist wichtig, dass in einzelnen Schilddrüsen ein jodfreies Thyreoglobulin gefunden wurde; denn damit ist wohl gezeigt, dass die Bildung des Eiweisskörpers vor sich geht ohne die Gegenwart von Jod und dass das Jod erst nachträglich von dem fertigen Eiweisskörper gebunden wird. Wichtig ist aber auch, dass dieser Eiweisskörper erst dann seine Wirksamkeit erlangt, wenn er mit Jod eine Verbindung eingegangen ist. Unter eigentlichem Thyreoglobulin sollte man daher wohl nur den jodhaltigen, wirksamen Eiweisskörper verstehen, während der jodfreie eher als Vorstufe aufzufassen sein dürfte.

Dass das Thyreoglobulin derjenigen Drüsen, in welchen es in grosser Menge vorkommt, und das der Colloidkröpfe jodärmer ist als das der normalen Drüsen, welche eine geringere Menge davon enthalten, hat offenbar seinen Grund darin, dass das der Schilddrüse zur Verfügung stehende Jod sich über einen grösseren Theil von Thyreoglobulin vertheilen muss, denn solche colloidreichen Drüsen bezw. Kröpfe haben einen höheren absoluten Jodgehalt als normale Drüsen. Für eine solche Erklärung spricht vor Allem die Thatsache, dass das Thyreoglobulin der Colloidkröpfe, wie wir gesehen haben, jodreicher werden kann, wenn eine vermehrte Jodzufuhr stattfindet.

Ob ein durch Einführung von Jod in den Organismus jodreicher gemachtes Thyreoglobulin eine stärkere physiologische Wirksamkeit entfaltet, als ein jodärmeres, ist noch nicht festgestellt, soll aber ermittelt werden.

Die an den Kalbsschilddrüsen gemachten Erfahrungen zeigen uns auch, dass Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung mit solchen im anatomischen Bau einhergehen,



sich vorfindet, welche eine einfache Hyperplasie des Drüsen-  
gewebes aufweisen, während jodhaltiges Thyreoglobulin in den  
Drüsen und Kröpfen, welche Colloid enthalten, vorkommt.  
Der Unterschied, welchen die Anatomen zwischen beiden  
Kropffarten machen, findet daher auch seine Begründung in  
ihrem chemischen Verhalten. Vom physiologisch-chemischen  
Standpunkt aus darf daher auch an eine verschiedene Aetiologie  
der beiden Kropffarten appellirt werden.

Die an den Colloidstrumen gemachten Befunde lassen  
vermuthen, dass es sich bei den Colloidkröpfen um eine An-  
schoppung des normalen Secretionsproduktes, des Colloids  
bezw. Thyreoglobulins, handelt. Worauf ein solches beruht,  
bedarf noch der Erklärung, möglicher Weise kommt auch eine  
Hypersecretion der Drüse in Betracht; eine Störung im Abfluss  
muss aber dennoch gleichzeitig bestehen, denn wäre eine  
solche nicht vorhanden, so wäre doch anzunehmen, dass das  
vermehrte Secret freien Abfluss habe.

Bei den hypertrophischen Strumen dagegen liegt die  
Ursache in einer Vermehrung der secernirenden Zellen und  
des in denselben vorhandenen jodfreien Eiweisskörpers.

Stellen sich diese angedeuteten Verhältnisse auch bei  
genauer mikroskopischer Untersuchung als constant heraus,  
d. h. ist das jodhaltige Thyreoglobulin durchwegs bloss in  
solchen Drüsen zu finden, welche auch bei der histologischen  
Untersuchung Colloid erkennen lassen, und jodfreies nur bei  
solchen, in denen auch das Mikroskop kein Colloid aufzufinden  
vermag, dann muss man wohl annehmen, dass erst bei der  
Ausscheidung des Colloids aus der Follikelzelle der Eiweiss-  
körper sich jodirt und zu physiologisch wirksamem Thyreo-  
globulin wird. Ein solches Verhalten stünde nicht vereinsamt  
in der Physiologie da, ich erinnere bloss an die Entstehung  
der Enzyme aus den Zymogenen, an das Freiwerden der Salz-  
säure im Magen im Momente ihres Austritts aus den secerniren-  
den Zellen.

Die eben ermittelten Thatsachen werfen, wie leicht er-  
sichtlich, zahlreiche Fragen auf, die zu weiterer Forschung

ermuntern. Dass diese aber gleichzeitig sowohl die histologischen als auch die chemischen Verhältnisse im Verein mit den Ergebnissen der experimental-physiologischen Prüfung berücksichtigen muss, geht ohne Weiteres aus dem Mitgetheilten hervor. Derartige Untersuchungen sind bereits im Gang.

---

Die Kenntniss des Jodgehalts des Thyreoglobulins versetzt uns in die Lage, auf einfache Weise die approximative Menge des in den Schilddrüsen und den Kröpfen vorhandenen Thyreoglobulins festzustellen. Es genügt, dazu den Gesamtjodgehalt einer Drüse zu bestimmen und denselben auf Thyreoglobulin umzurechnen. Allerdings liefert diese Methode keine genauen Resultate, denn wir haben gesehen, dass der Jodgehalt innerhalb ziemlich weiter Grenzen schwanken kann; dennoch lassen sich, wenn man von Mittelwerthen ausgeht, Ziffern aufstellen, die von der Wirklichkeit nicht allzu sehr entfernt sein dürften, um so mehr, als es gelingt, bei sorgfältiger Extraction der Drüsen die annähernd berechnete Menge Thyreoglobulin zu gewinnen.

Baumann<sup>1)</sup> fand in Schilddrüsen vom Menschen aus Hamburg, mit einem mittleren Trockengewicht von 4,6 g, durchschnittlich 3,83 mg Jod. Wenn wir den Mittelwerth aus den untersuchten Präparaten aus Hamburg der Berechnung zu Grunde legen, nämlich 0,26 ‰, so würde das 1,6 g trockenes Thyreoglobulin ausmachen. Letzteres würde also ungefähr den dritten Theil des Trockengewichtes der Drüsen betragen. Dieses Verhältniss ist jedoch kein constantes.

Bei Kröpfen ist die Menge des Thyreoglobulins eine entsprechend grössere und kann unter Umständen bei umfangreichen Strumen bis auf 30 g und mehr (trocken) steigen.

Bei Thieren lässt sich der approximative Thyreoglobulin-gehalt der Schilddrüse auf ähnliche Weise berechnen.

Ich hatte früher<sup>2)</sup> beispielsweise in einer Schilddrüse vom Schwein 3,01 mg Jod gefunden. Da das Thyreoglobulin

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 1.

<sup>2)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 308.

der Drüse von 6,55 g. Das Verhältniss vom Thyreoglobulin zum Gesamtgewicht der Drüse ist somit wie 1 : 10. Eine andere Drüse enthielt 0,89 mg Jod = 1,9 g Thyreoglobulin bei einem Trockengewicht der Drüse von 3,85 g.; Verhältniss des ersteren zu letzterem = 1 : 2. Eine dritte Drüse enthielt 6,29 mg Jod = 1,3 g. Thyreoglobulin; Trockensubstanz der Drüse 1,95 g. Gewichtsverhältniss beider wie 2 : 3. Auch hier lässt sich der Zusammenhang zwischen dem makroskopisch sichtbaren Colloid und dem Thyreoglobulingehalt deutlich nachweisen. In der ersten Drüse, welche nur wenig Colloid enthielt, betrug das Thyreoglobulin bloss den zehnten Gewichtstheil der Drüse, bei der zweiten, die colloidreich war, die Hälfte und bei der dritten, die durchwegs mit Colloid ausgefüllt war, zwei Drittel der ganzen Drüse.

In Hammelsschilddrüsen fand ich das eine Mal 3 mg Jod in einer Drüse, das entspricht, bei dem durchschnittlichen Jodgehalt des Thyreoglobulins dieser Thiere von etwa 0,39%, 0,7 g Thyreoglobulin bei einem Trockengewicht der Drüse von 1,18 g. Ein anderes Mal fand ich 4,57 mg Jod, entsprechend 1,1 g Thyreoglobulin, Trockengewicht der Drüse 1,7 g. Gewichtsverhältnisse beider wie 1 : 2 bzw. 2 : 3.

Aus diesen Befunden ergibt sich, dass die Schilddrüse relativ ansehnliche Mengen Thyreoglobulin enthält.

Bemerken will ich noch, dass das Thyreoglobulin den weitaus grössten Theil des Colloids ausmacht, das Nucleoproteid dagegen bloss einige wenige Gewichtsprocente des letzteren beträgt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass es nur von den Nucleoproteiden der Zellkerne herrührt, welche, wie uns die histologische Untersuchung lehrt, beim Bersten der Follikelepithelien in den Follikelinhalt gerathen.

Zum Schluss möchte ich noch Herrn Prof. Hofmeister für einige mir im Laufe der Untersuchungen brieflich mitgetheilte Rathschläge meinen wärmsten Dank aussprechen.

---

# Ueber die Eiweisskörper der Thymusdrüse.

Von

**W. Huiskamp.**

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Utrecht.)

(Der Redaction zugegangen am 17. Januar 1901.)

Der Zweck dieser Arbeit war in erster Linie, das von Lilienfeld aus der Thymusdrüse erhaltene Nucleohiston näher kennen zu lernen. Erstens kam es mir wahrscheinlich vor, dass die von Lilienfeld untersuchte Substanz nicht genügend gereinigt war. Dieselbe war mittelst Fällung des Wasserextractes der Drüse mit Essigsäure, Lösung des Niederschlages in Natriumcarbonat, nochmaliger Fällung mit Essigsäure und Auswaschen des Niederschlages mit essigsäurehaltigem Wasser, Alkohol und Aether, bereitet worden.<sup>1)</sup>

Der Niederschlag enthält aber, ausser Nucleohiston, auch anderes Eiweiss, denn das von der Essigsäurefällung abfiltrirte Extract enthält kaum mehr Eiweiss, während doch, wie Lilienfeld selbst gefunden hat, die Drüse neben Nucleohiston noch ein anderes Nucleoproteid enthält, welches, wie sich nachweisen lässt, bei der Extraction mit Wasser in Lösung übergeht.

Zweitens wünschte ich den Einfluss des Nucleohistons auf die Gerinnung des Fibrinogens zu untersuchen. Die Auffassung Lilienfeld's ist nämlich in verschiedener Hinsicht im Widerspruch mit den von Pekelharing mitgetheilten Befunden.<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XVIII, S. 478.

<sup>2)</sup> Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam, 1892.

des Nucleohistons und des anderen Nucleoproteids, so dass ich in der Lage war, beide Stoffe genauer zu untersuchen.

Als meine Untersuchung schon beinahe beendet war, erschienen zwei Arbeiten über denselben Gegenstand, eine von Bang und eine von Malengreau. Auch diese Forscher bemerken, dass bei der Fällung des Nucleohistons mittelst Essigsäure das andere Nucleoproteid mitgefällt wird.

Bang<sup>1)</sup> kam zu dem Schluss, dass, was Nucleohiston genannt wird, eigentlich nichts Anderes ist als ein Gemenge von Nucleoproteid, Histon und Nucleinsäure, ein Schluss, welcher von Kossel<sup>2)</sup> sogleich als unbegründet zurückgewiesen wurde.

Malengreau<sup>3)</sup> fand, dass das Nucleoproteid aus dem Thymusextracte von Ammonsulfat früher gefällt wurde als das Nucleohiston. Er benutzte diese Eigenschaft zur Trennung des Nucleohistons vom Nucleoproteid.

Im Thymusextracte wurde mit Essigsäure ein Niederschlag hervorgerufen, welcher ausgewaschen und abfiltrirt wurde; das Filtrat enthielt noch ein wenig Eiweiss; der Niederschlag wurde mit Natriumcarbonat oder Natronlauge gelöst, wieder mit Essigsäure gefällt und diese Behandlung so oft wiederholt, bis im Filtrate kein Eiweiss mehr vorhanden war. Schliesslich wurde der Niederschlag wieder in Natriumcarbonat oder Natronlauge gelöst.

Es stellte sich alsdann heraus, dass, wenn diese Lösung zu 30—45% mit Ammonsulfat gesättigt wurde, das Nucleoproteid ausfiel, während das Nucleohiston erst, wenn die Flüssigkeit zu 56—72% mit Ammonsulfat gesättigt war, gefällt wurde.

Malengreau fand weiter, dass das Nucleoproteid bei Behandlung mit 1%iger HCl ein Histon lieferte, welches aber von dem aus Nucleohiston erhaltenen verschieden war; das Histon aus dem Nucleoproteid wurde von Ammonsulfat schon

---

1) Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 508.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 520.

3) La cellule, t. XVII, p. 393.

aus seiner Lösung gefällt, wenn die Flüssigkeit zu 45% oder noch weniger mit Ammonsulfat gesättigt war; das Histon aus Nucleohiston brauchte zur Fällung mehr Ammonsulfat; die Flüssigkeit musste wenigstens zu 55% mit diesem Salze gesättigt sein. Malengreau bemerkt, dass die relativen Mengen des im Thymusextracte enthaltenen Nucleoproteids und Nucleohistons nahezu gleich gross sind.

Sowohl im Nucleohiston, als im Nucleoproteid fand er Adenin und Guanin. Der Phosphorgehalt des Nucleoproteids war etwa 0,5%, derjenige des Nucleohistons etwa 4,5%.

### *Der Einfluss verdünnter Salzlösungen auf das Nucleohiston.*

Wird dem mittelst Colirens und Centrifugirens von Formelementen getrennten Wasserextracte der Thymusdrüse Chlorcalciumlösung zugesetzt, so bildet sich, wenn die Menge des zugesetzten  $\text{CaCl}_2$  richtig gewählt wird, ein ausgiebiger Niederschlag.<sup>1)</sup>

Derselbe lässt sich leicht abcentrifugiren und ist in geringem Ueberschuss von Salzen, auch von  $\text{CaCl}_2$  löslich, weniger löslich in Wasser, leicht löslich aber, obgleich mit Opalescenz, in mit so wenig Ammoniak versetztem Wasser, dass die alkalische Reaction mit Hülfe von Lackmuspapier gerade deutlich wird.

Die Menge des Calciumchlorids, mit welcher der Niederschlag so gross als möglich wird, ist 1 ccm. 10%iges  $\text{CaCl}_2$  auf 100 ccm. des Extractes, welches dadurch also einen Gehalt von  $\pm 0,1\%$  an  $\text{CaCl}_2$  erhält. Man kann aber, ohne dass sich der Niederschlag merkbar löst,  $\text{CaCl}_2$  bis zu einem Gehalt von 0,5% zusetzen.

Wird weniger als 1 ccm. 10%iges  $\text{CaCl}_2$  auf 100 ccm. Flüssigkeit gebraucht, so bleibt die Fällung unvollständig, während, wenn der Gehalt 0,5%  $\text{CaCl}_2$  übersteigt, die

---

<sup>1)</sup> Wo in der Folge von Thymusextract die Rede ist, wird ein Auszug gemeint, welcher aus 150—200 g vom anhängenden Fett gereinigten und feingewiegten Kalbsthymusdrüse mittelst 15—18ständiger Extraction mit 500—600 ccm. Wasser bereitet worden ist.

in Ueberschuss von Calciumchlorid löst.

Zu untersuchen war, ob der erhaltene Niederschlag aus Nucleohiston bestand; die grosse Menge des Niederschlages und die Unlöslichkeit desselben in Essigsäure machten dies schon wahrscheinlich.

Durch Veraschung der Substanz mit  $\text{KNO}_3$  und  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  wurde nachgewiesen, dass der Niederschlag Phosphor enthielt. Weiter lieferte der Niederschlag bei Behandlung mit 0,8%iger  $\text{HCl}$  (0,8 g  $\text{HCl}$  in 100 g der Lösung) in ausgiebiger Menge Histon.<sup>1)</sup>

Das Nucleohiston wurde hierzu folgender Weise bereitet. Der mit  $\text{CaCl}_2$  erhaltene Niederschlag wurde abcentrifugirt und in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks gelöst.<sup>2)</sup> Dann wurde die Lösung filtrirt und wieder mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt, der Niederschlag abcentrifugirt, mit 0,8%iger  $\text{HCl}$  gemischt und darauf einige Stunden sich selbst überlassen. Das Nuclein bleibt dann im Niederschlage, indem das Histon sich in der Salzsäure löst.

Dass die ungelöst gebliebene Substanz thatsächlich Nuclein ist, geht daraus hervor, dass dieselbe Eiweissreactionen gibt (nur nicht die Adamkiewicz'sche Reaction), Phosphor enthält und in Säuren, auch in Essigsäure, unlöslich ist, während Purinbasen, hauptsächlich Adenin, in grosser Menge daraus zu erhalten sind. In verdünntem Ammoniak ist dieses Nuclein löslich und kann dann mittelst Essigsäure wieder gefällt werden.

1) Wie es scheint, hat Lilienfeld, obgleich er von 0,8%iger  $\text{HCl}$  spricht, eine schwächere Salzsäurelösung gebraucht. Er erwähnt wenigstens (l. c. Bd. XX, S. 114), dass er zur Spaltung des Nucleohistons dasselbe mit einer Lösung von 8 ccm. rauchender Salzsäure auf 1000 ccm. Wasser, also 0,2—0,3%iger  $\text{HCl}$  entsprechend, behandelt hat.

2) Für das Erhalten einer gut brauchbaren Lösung ist es in diesem Falle empfehlenswerth, das Nucleohiston mit möglichst wenig  $\text{CaCl}_2$  zu fällen, da der Niederschlag sich um so besser in Wasser löst, je weniger  $\text{CaCl}_2$  er enthält; ich habe deshalb nur soviel Calciumchlorid zugesetzt, dass die Flüssigkeit davon 0,1% enthielt, was für eine vollständige Fällung ausreicht.

Das Histon ist, wie gesagt, in der Salzsäure gelöst; mittelst Ammoniak kann es daraus nur sehr unvollständig ausgefällt werden, viel besser aber, wenn die salzsaure Lösung zuvor dialysirt worden ist. Wird nämlich zu der Lösung in 0,8%iger HCl Ammoniak zugesetzt, so bildet sich eine nicht unbeträchtliche Menge von Ammoniumchlorid; ich fand aber, dass  $\text{NH}_4\text{Cl}$  die Fällung des Histons zu hindern im Stande ist. Kochsalz, Chlorcalcium und andere Salze haben dieselbe Wirkung. Auch konnte das mittelst Ammoniak gefällte Histon durch Zusatz einer genügenden Menge von Chlorammonium völlig wieder gelöst werden.

Bang<sup>1)</sup> erwähnt, dass Ammonsalze überhaupt die Fällung der Histone mittelst Ammoniak fördern. Welcher Ursache es zuzuschreiben ist, dass ich in dieser Hinsicht ein ganz entgegengesetztes Resultat erhielt, ist mir nicht klar geworden.

Ist die salzsaure Histonlösung bis auf nahezu neutrale Reaction dialysirt worden, so kann das Histon mittelst Ammoniak gefällt werden und es löst sich im Ueberschuss desselben nicht; auch mittelst Natronlauge kann das Histon gefällt werden; dann ist es aber im Ueberschuss vollkommen löslich.

Die Identität des mit  $\text{CaCl}_2$  im Thymusextracte erhaltenen Niederschlages mit Nucleohiston wird schliesslich von den später zu erwähnenden Elementaranalysen bewiesen, welche, insoweit als dieselben einen relativ hohen N- und P-Gehalt, dagegen einen ziemlich niedrigen C-Gehalt als Resultat lieferten, mit denjenigen Lilienfeld's übereinstimmen.

Ich bemerke hier schon, dass das neben dem Nucleohiston im Thymusextracte vorhandene Nucleoproteid von Calciumchlorid nur sehr unvollständig gefällt wird. Das zweimal mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston kann also als vom Nucleoproteid gereinigt betrachtet werden, wie es später noch des Näheren nachgewiesen werden wird.

Es lag auf der Hand, das von Calciumchlorid gefällte Nucleohiston als eine Calciumverbindung zu betrachten, wie das unter Anderem bei dem Casein aus der Milch der Fall ist.

---

1) Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 468.



mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston thatsächlich eine Calciumverbindung war; die Möglichkeit war nicht ohne Weiteres ausgeschlossen, dass hier vielleicht eine molekulare Verbindung von Nucleohiston mit  $\text{CaCl}_2$  vorlag, oder auch, dass gar keine Verbindung mit Calcium oder mit Calciumchlorid stattgefunden hatte, sondern dass das Nucleohiston in Chlorcalciumlösung einer gewissen, ziemlich geringen Concentration unlöslich war.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde folgender Weise verfahren:

In dem von den Formelementen getrennten Thymus- auszuge wurde das Nucleohiston mittelst Essigsäure gefällt; der Niederschlag wurde sodann zur Entfernung der Phosphorsäure mit Wasser ausgewaschen und darauf in Wasser mit möglichst wenig Ammoniak gelöst. Aus dieser Lösung wurde das Nucleohiston durch Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  wieder gefällt; der Niederschlag wurde dann unter Alkohol gebracht. Da Alkohol etwa 12%iges  $\text{CaCl}_2$  löst und die im Niederschlage vorhandene Flüssigkeit nur 0,1%  $\text{CaCl}_2$  gelöst enthielt, konnte in dieser Weise das Nucleohiston vom überschüssigen  $\text{CaCl}_2$  getrennt werden; der Niederschlag wurde mit Alkohol ausgewaschen, bis der abfiltrirte Alkohol kein Chlorcalcium mehr enthielt. Das Nucleohiston wurde dann unter Aether gebracht, abfiltrirt und getrocknet.

Die Asche der auf diese Weise bereiteten, also kein freies Kalksalz enthaltenden Substanz enthält immer Calcium in grosser Menge, woraus hervorgeht, dass das Nucleohiston entweder an Calcium oder an  $\text{CaCl}_2$  gebunden war.

Sollte das mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston als eine Calciumverbindung zu betrachten sein, so wäre diese Verbindung mit einem Salze zu vergleichen, wo das Calcium das Metall, das Nucleohiston den Säurerest darstellte, und dann wäre es wahrscheinlich, dass stärkere Säuren dieses Calciumsalz zu zerlegen im Stande sein würden, sodass z. B. bei der Extraction mit nicht allzuschwacher Essigsäure im Filtrate Calciumacetat zu finden und das Nucleohiston ungelöst auf dem Filter

bleiben würde. Das Filtrat würde also mit Kaliumoxalat Kalkreaction, dagegen mit Silbernitrat keine Chlorreaction geben müssen. War aber das Nucleohiston mit  $\text{CaCl}_2$  verbunden, so würde bei der Extraction mit Essigsäure das Filtrat, wenn wenigstens Zerlegung stattfand,  $\text{CaCl}_2$  enthalten müssen, mithin sowohl eine Kalk- als eine Chlorreaction geben; falls keine Zerlegung stattfand, würde das Filtrat keine dieser beiden Reactionen geben müssen. Es stellte sich jetzt heraus, dass bei der Extraction mit 5%iger Essigsäure das Filtrat eine starke Kalkreaction, keine Spur aber einer Chlorreaction zeigte, wodurch also nachgewiesen war, dass das mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston an Calcium gebunden und also sehr wahrscheinlich als ein Calciumsalz zu betrachten war.

Dasselbe Resultat wurde durch Fällung des Nucleohistons mit  $\text{CaCl}_2$  unmittelbar aus dem Thymusextracte erhalten; zur weiteren Reinigung wurde es in Wasser mit ein Paar Tropfen verdünntem Ammoniak gelöst und die Lösung zur Entfernung des möglicher Weise gebildeten Tricalciumphosphats längere Zeit centrifugirt; die Flüssigkeit wurde dann ohne Beimischung des sehr geringen Bodensatzes abgegossen und wieder mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt; der Niederschlag wurde mit Alkohol ausgewaschen, unter Aether gebracht und getrocknet. Bei der Extraction dieser Substanz mit 5%iger Essigsäure zeigte das Filtrat gleichfalls eine starke Kalk-, dagegen keine Chlorreaction.

Auch Kaliumoxalat ist im Stande, das Calcium-Nucleohiston zu zerlegen, wie folgender Versuch zeigt.

Im Thymusextracte wurde das Nucleohiston mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt; der Niederschlag wurde in Wasser mit ein Paar Tropfen verdünntem Ammoniak gelöst und die Lösung filtrirt. Darauf wurde dem Filtrate Kaliumoxalat zugesetzt, in Ueberschuss, so dass es mehr als genügte, alles Calcium als Calciumoxalat zu fällen. Das Gemisch blieb 24 Stunden stehen, damit das Calciumoxalat möglichst vollständig gefällt wurde. Sodann wurde zweimal durch einen Propfen zusammengepressten Filtrirpapiers,<sup>1)</sup> darauf nochmals durch ein sehr dichtes asche-

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 234.

freies Filter filtrirt. Es waren nun im Filtrate mikroskopisch keine Calciumoxalatkrystalle mehr zu finden; das Filtrat enthielt jedoch noch eine ziemliche Menge Kaliumoxalat, denn bei dem Versetzen eines Tropfens der Lösung mit  $\text{CaCl}_2$  wurden mikroskopisch zahlreiche Krystalle von Calciumoxalat sichtbar.

Zur Entscheidung der Frage, ob das Nucleohiston in dieser Lösung noch Calcium enthielt, wurde es mit dem zweifachen Volumen Alkohol und Aether gefällt, der Niederschlag wurde abfiltrirt und getrocknet; das Gewicht der bei  $110^\circ$  getrockneten Substanz betrug 0,437 g; diese Menge wurde mit ungefähr 10 ccm. 10%iger Essigsäure gekocht, wodurch das Calcium, wenn noch anwesend, als Calciumacetat in Lösung übergehen musste. Beim Kochen löste sich das Nucleohiston nicht; es wurde also abfiltrirt und dem Filtrate Kaliumoxalat zugesetzt, nachdem die saure Reaction mittelst Ammoniak abgestumpft war. Nach 24 Stunden war kein Niederschlag von Calciumoxalat entstanden; ein äusserst geringer Bodensatz hatte sich gebildet, worin aber mikroskopisch keine Calciumoxalatkrystalle zu entdecken waren. Wäre das Calcium dem Nucleohiston nicht durch das Kaliumoxalat entzogen, so hätte ein Niederschlag von ungefähr 18 mg Calciumoxalat entstehen müssen, weil nach den später anzuführenden quantitativen Bestimmungen das mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston ungefähr  $1\frac{1}{3}\%$  Calcium enthält.

Wie schon bemerkt, ist die Verbindung von Nucleohiston mit Calcium im Ueberschuss von Chlorcalcium löslich; die Lösung beginnt bei einem Gehalt von  $\pm 0,6\%$   $\text{CaCl}_2$ ; enthält die Flüssigkeit ungefähr  $2\%$   $\text{CaCl}_2$ , so ist alles wieder gelöst.

Ausser Chlorcalcium vermögen auch andere Salze der Alkali- und Erdalkalimetalle bei einem bestimmten Gehalt an Salz das Nucleohiston zu fällen.

$\text{BaCl}_2$  fällt bei einem Gehalt von  $0,1\%$  wie  $\text{CaCl}_2$  das Nucleohiston vollkommen; der Niederschlag ist löslich im Ueberschuss von Salzen (in  $5\%$ igem  $\text{BaCl}_2$  löst er sich ganz) und einigermassen auch in Wasser, leicht löslich in Wasser bei sehr schwach alkalischer Reaction. Bei der Behandlung mit  $0,8\%$ iger  $\text{HCl}$  liefert der Niederschlag Histon.

$\text{MgSO}_4$  fällt das Nucleohiston bei einem Gehalt von 0,2% auch meistens vollkommen; oft aber bekommt man erst eine vollständige Fällung, wenn man das Extract einige Stunden mit dem Magnesiumsulfat stehen lässt. Das Magnesium-Nucleohiston ist etwas besser im Wasser löslich, als das Baryum- und Calcium-Nucleohiston. Bei einem Gehalt von  $\pm 2\%$   $\text{MgSO}_4$  ist der Niederschlag wieder völlig gelöst.

Mit NaCl bekommt man immer nur eine theilweise Fällung; bleibt das Extract etwas länger mit dem Kochsalz stehen, so vermehrt sich der Niederschlag nicht: am besten wird das Nucleohiston gefällt, wenn soviel Kochsalz zugesetzt wird, dass die Flüssigkeit davon 0,9% enthält; es ist das bemerkenswerth insoweit, als das Gemisch bei diesem Gehalt isotonisch ist mit den Körperflüssigkeiten. Das Natrium-Nucleohiston bildet einen klebrigen Niederschlag, der sich sehr gut löst in Wasser, ohne dass Zusatz von Ammoniak erforderlich wäre; zumal wenn man den mit Wasser gemischten Niederschlag einige Zeit bei 37° stehen lässt, entsteht eine klare, bläuliche Lösung. Wird dieser Lösung NaCl zugesetzt, bis der Gehalt daran  $\pm 0,9\%$  beträgt, so wird das Natrium-Nucleohiston wieder gefällt, während bei einem Gehalt von 2 bis  $2\frac{1}{2}\%$  NaCl der ganze Niederschlag wieder gelöst wird. Der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt (worüber unten Näheres) stimmt mit demjenigen des Calcium-Nucleohistons überein.

Bei der Behandlung mit verdünnter Salzsäure wird auch das Natrium-Nucleohiston zerlegt in Nuclein und Histon; das hierzu benutzte Nucleohiston war aus dem Thymusextracte mit Kochsalz gefällt, sodann in Wasser gelöst und wieder mit 0,9%iger NaCl gefällt, wodurch zugleich das Nucleoproteid, welches sich, wie auch Bang fand, in 0,9%iger NaCl löst, entfernt wurde; überdies ist das Nucleoproteid in 0,8%iger HCl löslich, sodass das Nuclein, aus Natrium-Nucleohiston bereitet, kein Nucleoproteid mehr enthält. Die von diesem Nuclein gegebenen Eiweissreactionen sind also nicht einer Verunreinigung mit Nucleoproteid zuzuschreiben und man hat es hier zweifelsohne mit Nuclein, nicht mit Nucleinsäure zu thun.

Zur Fällung des mittelst 0,8%iger HCl aus Natrium-

die Histonlösung zu dialysiren; erst dann bekommt man mit Ammoniak einen ausgiebigen Niederschlag. Durch die Dialyse wird die Reaction neutral, während das Histon gelöst bleibt.

Ausser der Ammoniakreaction besitzt die dialysirte Flüssigkeit auch die anderen Eigenschaften einer Histonlösung; es werden z. B. Hühnereiweiss und Fibrinogen durch dieselbe gefällt. Mittelst Salpetersäure entsteht ein Niederschlag, der sich beim Erhitzen löst.

Bei der Behandlung mit Millon's Reagens entsteht kein oder nur ein geringer rother Niederschlag; die ganze Flüssigkeit erhält aber eine ziemlich dunkelrothe Färbung. Es ist nicht nöthig, die Histonlösung mit dem Millon'schen Reagens zu kochen: die rothe Farbe entsteht, wenn auch sehr langsam (z. B. in 24 Stunden), ebenso leicht oder selbst besser bei Zimmertemperatur.

Chlorkalium und Chlorammonium verhalten sich dem Nucleohiston gegenüber wie Chlornatrium. Mit Natriumsulfat und Kaliumsulfat entsteht im Thymusextracte ein geringerer Niederschlag, als mit Chlornatrium.

Es ergibt sich also aus dem Obenstehenden, dass die Alkaliverbindungen des Nucleohistons in Wasser löslich sind und dass sie bei einem bestimmten Gehalt der Flüssigkeit an Alkalisalz wenigstens theilweise gefällt werden; die Erdalkaliverbindungen sind viel weniger löslich in Wasser und ganz unlöslich in Lösungen von 0,1 bis 0,3% der Erdalkalisalze.

Zur Fällung des Nucleohistons mittelst 0,9%iger NaCl oder anderen Alkalisalzen ist es nothwendig, das frische Material zu benutzen; wenn der aus der Drüse bereitete Extract mehr als 24 Stunden alt ist, erhält man meistens einen geringeren Niederschlag; es scheint, dass die Zusetzung von Chloroform, welche oft angewendet wird, um Fäulniss vorzubeugen, die Fällung des Nucleohistons mittelst Alkalisalzen auch einigermaßen erschwert; zur Fernhaltung von Fäulniss verfährt man also wohl am besten, wenn man die Extraction bei niedriger Temperatur sich vollziehen lässt.

Ich habe versucht, zu ermitteln, welche Concentrationen

der verschiedenen Alkalisalze eine möglichst vollständige Fällung verursachen. Es geschah dies auf folgende Weise.

Die feinzerhackte Thymusdrüse wurde mit Wasser extrahiert und im Extracte mittelst Zusetzung von Kochsalzlösung bis 0,9% das Nucleohiston gefällt. Der Niederschlag wurde abcentrifugiert und in Wasser gelöst; um möglichst wenig Kochsalz in der Lösung zu erhalten, wurden die Centrifugirröhrchen mit destillirtem Wasser rasch ausgewaschen zur Entfernung des der Röhrenwand anhaftenden 0,9%igen Kochsalzes. Wenn das Auswaschen nur kurz dauert, löst sich der Niederschlag nicht merklich. Sodann wurde der Niederschlag mit ungefähr dem zwanzigfachen Volumen destillirten Wassers gemischt, worin es sich nach einiger Zeit ganz löste; die Lösung wurde filtrirt. Das Filtrat zeigte nur eine sehr geringe Opalescenz und enthielt sicher nicht mehr als 0,05% NaCl.

Eine bestimmte Anzahl Cubikcentimeter (6 oder 12) dieser Lösung wurde nun abgemessen und in ein Reagensröhrchen gebracht. Hierauf wurde tropfenweise die Alkalisalzlösung von bekannter Stärke (meistens eine bei 15° ganz oder halb gesättigte Lösung) zugesetzt, bis sich der Niederschlag beim Zusetzen von mehr Salz nicht vermehrte.

Die ersten Tropfen verursachen einen Niederschlag, der sich beim vorsichtigen Umschütteln wieder löst; die Flüssigkeit hat eine etwas stärkere Opalescenz bekommen; bei dem Zusatz des vorletzten Tropfens wird das Röhrchen in der Regel erst undurchsichtig; wird darauf noch ein Tropfen zugesetzt, so entsteht, wenn man wenigstens NaCl, KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder  $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na}$  zur Fällung anwendet, ein grobflockiger, klebriger Niederschlag, welcher sich ziemlich schnell am Boden absetzt; vergrößert man nun den Salzgehalt noch mehr, so vermehrt sich der Niederschlag nicht; es ist dies eben dadurch ziemlich genau wahrnehmbar, weil der Niederschlag grobflockig ist und sich absetzt. Bei der Fällung mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  oder  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ist der Niederschlag meistens nicht so gross und setzt sich nicht so schnell am Boden ab; dennoch ist auch hier mit hinreichender Genauigkeit zu beobachten, wenn die richtige Menge Salz zugesetzt ist.

gebraucht; das Volumen der Tropfen war vorher genau bestimmt worden. Aus der Anzahl der zugesetzten Tropfen und der bekannten Stärke der Salzlösung konnte alsdann berechnet werden, wieviel Procent Salz das Gemisch im Reagensröhrchen enthielt. Man findet in dieser Weise die geringste Menge Salz, welche den möglichst vollständigen Niederschlag verursacht.

Für einige Salzlösungen fand ich die folgenden Concentrationen. (Der Gehalt von höchstens 0,05 %iger NaCl, welcher in der Nucleohistonlösung vorhanden war, ist ausser Betracht gelassen.)

NaCl	= 0,88 %,
KCl	= 1,13 %.
NH <sub>4</sub> Cl	= 0,84 %,
C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> Na	= 1,31 %,
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	= 1,42 %,
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	= 1,60 %.

Die Concentrationen des NaCl, KCl, NH<sub>4</sub>Cl und C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na sind ungefähr isotonisch mit den Körperflüssigkeiten; die Zahlen für Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zeigen davon jedoch nicht unerhebliche Abweichungen.<sup>1)</sup>

Das freie Nucleohiston, welches gebildet wird, wenn z. B. eine Lösung von Calciumnucleohiston mit nicht allzu schwacher Essigsäure behandelt wird, ist unlöslich in Wasser; man kann den durch Essigsäure hervorgerufenen Niederschlag mit Wasser auswaschen, bis das Waschwasser vollkommen neutral reagirt; es zeigt sich alsdann, dass der Niederschlag völlig ungelöst geblieben ist. Oft zeigt das Waschwasser der letzten Auswaschungen eine sehr geringe Opalescenz; die Flüssigkeit enthält dann aber so wenig Eiweiss, dass Salpetersäure keine Trübung verursacht und die Xanthoproteinreaction, auch nach Verstärkung derselben mittelst Ammoniak, nur sehr schwach sichtbar ist. Wenn aber eine so geringe Menge Eiweiss noch eine sichtbare Opalescenz verursacht, so darf man annehmen, dass dieses Eiweiss nicht gelöst vorhanden ist, sondern so fein zertheilt vorkommt, dass es durch Centrifugiren oder

<sup>1)</sup> Auch von Ammonsulfat, Kalium- und Natriumnitrat, Kaliumoxalat und Kaliumtartrat wird das Nucleohiston gefällt und löst sich in Ueberschuss.

Filtriren nicht ganz entfernt werden kann; und sollte auch diese Meinung unrichtig sein und also eine Spur des freien Nucleohistons sich im Wasser lösen, so ist doch die betreffende Menge zu gering, um in Betracht zu kommen.

Der Auffassung nach, dass das Calciumnucleohiston ein Salz ist, muss, nachdem das Calcium mittelst Essigsäure demselben entzogen ist, das Nucleohiston als Säure zurückbleiben.

Dass nun der in der oben angegebenen Weise von Essigsäure gereinigte Niederschlag thatsächlich eine Säure darstellt, lässt sich leicht dadurch nachweisen, dass er Alkalien z. B. Ammoniak bindet. Setzt man nämlich dem in Wasser suspendirten Niederschlag ein wenig verdünntes Ammoniak zu, so bleibt die Reaction neutral, während ein Theil des Niederschlages sich löst; auch bei der weiteren Zusetzung von Ammoniak bleibt die Reaction neutral, bis sich der ganze Niederschlag gelöst hat. Offenbar hat sich das Ammoniaksalz des Nucleohistons gebildet, welches in Wasser sehr leicht löslich ist. Zur Kontrolle habe ich eine Menge des letzten Waschwassers genommen, gleich gross wie diejenige Menge Wasser, worin der Niederschlag suspendirt war, und demselben ebenso viel Ammoniak zugesetzt, als nöthig war, um den ganzen Niederschlag zu lösen; es zeigte sich nunmehr, dass diese Flüssigkeit mit Lackmuspapier oder mit Phenolphthalein stark alkalisch reagirte.

Da also das freie Nucleohiston in Wasser unlöslich, seine Verbindungen mit Erdalkalien darin wenig löslich sind, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass das Nucleohiston im wässrigen Thymusauszuge als Alkalisalz vorhanden ist, welche Verbindung in Wasser leicht löslich ist.

Bei der Fällung des Nucleohistons aus dem Thymusauszuge mit Calciumchlorid wird, wie gezeigt wurde, das Calciumsalz gebildet. Das Calcium vermag also das Alkalimetall aus seiner Verbindung mit Nucleohiston zu verdrängen. Man muss sich demnach vorstellen, dass z. B. aus Nucleohistonnatrium  $+ \text{CaCl}_2$  gebildet wird Nucleohistoncalcium  $+ 2 \text{NaCl}$ ; das Nucleohistoncalcium fällt alsdann aus, nicht nur weil es an und für sich schon weniger löslich ist als die



betreffenden Chlorcalciumlösung unlöslich ist.

Ebenso wie  $\text{CaCl}_2$  vermögen wahrscheinlich auch Baryum- und Magnesiumsalze, obwohl dies nicht unmittelbar nachgewiesen wurde, die Alkalimetalle aus ihren Verbindungen mit Nucleohiston zu verdrängen.

Die Löslichkeit der Salze des Nucleohistons kann also folgender Weise tabellarisch zusammengestellt werden.

Alkalisalze	{ löslich in Wasser, mehr weniger unlöslich in sehr verdünnten Alkalischalzlösungen (für $\text{NaCl} \pm 0,9\%$ ), löslich im Ueberschuss von Salzen.
Magnesiumsalz	{ ziemlich löslich in Wasser, unlöslich in 0,1 bis 0,3 %iger $\text{MgSO}_4$ , löslich in Ueberschuss von Salzen.
Calciumsalz	{ wenig löslich in Wasser, unlöslich in 0,1 bis 0,5 %iger $\text{CaCl}_2$ , löslich in Ueberschuss von Salzen.
Baryumsalz	{ wenig löslich in Wasser, unlöslich in 0,1 bis 1,8 %iger $\text{BaCl}_2$ , löslich in Ueberschuss von Salzen.
Schwere Metallsalze	{ unlöslich in Wasser, unlöslich in Salzlösungen.

Weil das Histon einen basischen Körper darstellt, ist es wahrscheinlich, dass die sauren Eigenschaften des Nucleohistons dem Nuclein zukommen.

Lilienfeld betrachtete das Nucleohiston als ein saures Salz, worin das Histon die Stelle des Metalls der gewöhnlichen Salze vertrat. Mit dieser Auffassung stimmt überein, dass das Nuclein sich mit Metallen zu verbinden vermag. Zur näheren Untersuchung dieser Verbindungen bereitet man das Nuclein auf gewöhnliche Weise mittelst Fällung des Nucleohistons mit Essigsäure und Digestion des Niederschlages während 12 bis 18 Stunden mit 0,8 %iger  $\text{HCl}$ ; das ungelöst gebliebene Nuclein wird sodann mit Wasser ausgewaschen und darauf in Wasser mit Hülfe von ein wenig Alkali gelöst; es braucht hierbei die Reaction nicht alkalisch zu werden; aus dieser Lösung kann das Nuclein mittelst Zusatz von nicht allzu geringen Mengen Alkali- oder Erdalkalisalzen gefällt werden. Der Niederschlag löst sich im Ueberschuss dieser Salze nicht.

Das mittelst Calcium-, Baryum- oder Magnesiumsalze gefällte Nuclein ist löslich in Alkalien, unlöslich in Wasser; durch Auswaschen mit Wasser kann also z. B. das mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nuclein von überschüssigem  $\text{CaCl}_2$  gereinigt werden. In der Asche des in dieser Weise von  $\text{CaCl}_2$  gereinigten Nucleins findet man immer eine grosse Menge Calcium, woraus hervorgeht, dass das mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nuclein eine Calciumverbindung darstellt.

Nach einer anderen Methode, durch Spaltung nämlich des Nucleohistons mit  $\text{Ba(OH)}_2$  oder  $\text{Ca(OH)}_2$ , erhielt Lilienfeld die Baryum- resp. Calciumverbindung des Nucleins. An dieser Stelle muss ich noch nebenbei bemerken, dass schon Lilienfeld (l. c. Bd. XVIII, S. 484) die Fällung der Barytverbindung des Nucleohistons mittelst  $\text{BaCl}_2$  erwähnt, ohne dass er aber diesen Befund des Näheren begründet.

Wird das mit 0,8%iger  $\text{HCl}$  bereitete Nuclein mittelst Natronlauge gelöst, so entsteht das Natriumsalz; setzt man dieser Lösung Natriumchlorid in nicht allzu geringer Menge zu, so fällt das Nucleinnatrium; durch Auswaschen mit Wasser kann der Niederschlag allmählich wieder gelöst werden. Es geht hieraus also hervor, dass die Verbindung des Nucleins mit Natrium löslich ist in Wasser, unlöslich aber in Salzlösungen; der einzige Unterschied gegen Nucleohistonnatrium ist, dass die letztere Verbindung sich im Ueberschuss von Salzen löst. Dasselbe gilt in Betreff der Kalium- und Ammoniumverbindungen.

Wenn man das mittelst 0,8%iger  $\text{HCl}$  bereitete Nuclein in Wasser mit ein wenig Alkali löst und in dieser Lösung mittelst  $\text{CaCl}_2$  einen Niederschlag hervorruft, bekommt man, wie gezeigt wurde, die Calciumverbindung des Nucleins. Auch hier vermag also, wie beim Nucleohiston, das Calcium die Alkalimetalle aus ihren Verbindungen mit dem Nuclein zu verdrängen.

Säuren, z. B. 0,8%ige  $\text{HCl}$ , zerlegen die Verbindung des Nucleins mit Calcium, sodass nach genügender Auswaschung mit 0,8%iger  $\text{HCl}$  in der Asche des Nucleins kein Calcium mehr vorhanden ist.

Bang hat aus dem Thymusauszuge eine Substanz bereitet, welche bei einem Gehalt von etwa 0,9% an Kochsalz

dieser Hinsicht also völlig übereinstimmt mit dem mittelst 0,9%iger NaCl gefällten Nucleohiston.

Die Methode, welcher Bang sich zur Darstellung dieser von ihm als Nucleinsäure betrachteten Substanz bediente, war kurz folgende:

Nach Entfernung des Nucleoproteids mittelst Extraction mit 0,9%iger NaCl wurde die Thymusdrüse mit Wasser ausgezogen und der Auszug mit Kochsalz gesättigt. Der dadurch gebildete Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat dialysirt; es wurde durch die Dialyse die Nucleinsäure gefällt. Man kann, zur Darstellung der Nucleinsäure, nach Bang auch unmittelbar im wässerigen Thymusauszuge mittelst Zusatz von Kochsalz bis zu einem Gehalt von 0,9% einen Niederschlag hervorrufen; man filtrirt ab, löst den Niederschlag in Wasser und sättigt die Lösung mit Kochsalz. Man bekommt jetzt wieder eine Fällung, welche abfiltrirt wird; im Filtrate fällt dann durch Alkohol die Nucleinsäure.

Nach dieser letzten Methode fällt Bang also den Thymusauszug unmittelbar mit 0,9%iger NaCl. Es besteht der so erhaltene Niederschlag ohne Zweifel aus Nucleohiston. Im Vorhergehenden ist gezeigt, dass man aus dem mit 0,9%iger NaCl verursachten Niederschlage Histon und Nuclein bekommen kann, und ist darauf hingewiesen worden, dass der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt übereinstimmt mit dem auf andere Weise erhaltenen Nucleohiston. Dieses Nucleohiston löst Bang in Wasser und sättigt die Lösung mit Kochsalz; filtrirt man den dadurch entstandenen Niederschlag ab, so kann nach Bang im Filtrate mittelst Alkohol die Nucleinsäure gefällt werden. Vom Nucleohiston ist also durch die Sättigung mit Kochsalz entweder Nucleinsäure abgespalten, auf welche Möglichkeit bereits von Kossel aufmerksam gemacht worden ist, oder auch der mittelst Alkohol hervorgerufene Niederschlag war keine Nucleinsäure.

Dass Bang aus dieser Substanz mittelst Extraction mit Salzsäure kein Histon erhalten konnte, ist kein Beweis dafür, dass kein Histon darin vorhanden war, weil die Histonlösung

von Bang nicht dialysirt wurde (es erhellt wenigstens aus seiner Beschreibung nichts davon); zur Fällung des Histon mit Ammoniak ist aber die vorherige Dialyse nothwendig.

Mittelst Salzsäure konnte Bang, wie er erwähnt, im Allgemeinen nur wenig Histon aus dem Thymusextracte bekommen; ich glaube das dem zuschreiben zu müssen, dass die Histonlösungen nicht dialysirt worden waren.

Es ist fernerhin bemerkenswerth, dass die Substanz, welche Bang als Nucleinsäure betrachtet, von 0,9%iger NaCl gefällt wird und sich dann in 2%iger NaCl wieder löst, weil auch dem Nucleohiston diese Eigenschaft zukommt.

Man möchte also dazu neigen, die Nucleinsäure Bang's für Nucleohiston zu halten, wenn dieser selbst nicht ausdrücklich erwähnte, dass die Substanz mehr als 8% Phosphor enthielt, keine Biuretreaction gab und aus ihrer Lösung von Essigsäure nicht gefällt wurde.

Da ich nicht in der Lage war, mich mit den Ausführungen Bang's näher zu beschäftigen, so glaube ich vorläufig annehmen zu müssen, dass durch die Sättigung mit Kochsalz Nucleinsäure vom Nucleohiston abgespalten wird.

Der wichtigste Schluss, zu welchem Bang kam, ist wohl dieser, dass im Thymusextracte kein Nucleohiston vorhanden sei, sondern dass er nur ein Gemisch von Nucleinsäure und Histon darstelle.

Dass mittelst Essigsäure im Thymusauszuge sowohl das Histon, als auch die Nucleinsäure gefällt wird, erklärt Bang dadurch, dass Eiweisskörper, welche mit Nucleinsäure zusammen in Lösung vorkommen, durch Essigsäure gefällt werden, wobei die Nucleinsäure mitgefällt wird. Die gewöhnliche Auffassung dieser Fällung ist indessen diese, dass die Nucleinsäure sich mit dem Eiweiss zu Nuclein oder Nucleoproteid verbunden hat, welche Verbindungen von Essigsäure gefällt werden. Wenn diese Erklärung die richtige ist, so muss man auch annehmen, dass im Thymusextracte die Nucleinsäure sich mit dem Histon verbunden hat, und dass diese Verbindung von der Essigsäure gefällt wird.

Nun gibt es aber noch andere Methoden zur Fällung

Aufassung Bang's die richtige, so wäre dafür keine Erklärung zu finden; man könnte sich noch vorstellen, dass die Nucleinsäure von Chlorcalcium als Calciumverbindung gefällt würde; das Histon wird jedoch, wie sich nachweisen lässt, von 0,1%igem  $\text{CaCl}_2$  nicht gefällt. Die Nucleinsäure hindert nach Bang die Fällung der Eiweisskörper mittelst Histon, und der Anwesenheit von Nucleinsäure im Thymusextracte ist es seines Erachtens zuzuschreiben, dass das Histon aus letzterem kein Eiweiss fällen kann. Man kann sich aber auf folgende Weise von der Unwahrscheinlichkeit dieser Meinung überzeugen. Eine gewisse Menge Histon wird gelöst in 0,2%iger  $\text{HCl}$ ; die Lösung wird dialysirt, bis die Reaction neutral geworden ist. (Sicherheitsshalber habe ich die Histonlösung noch  $\pm 18$  Stunden dialysirt, nachdem mit Lackmuspapier keine saure Reaction mehr nachgewiesen werden konnte.) Das Histon bleibt bei der Dialyse gelöst. Setzt man dem Thymusextracte ein wenig von dieser neutralen Lösung zu, so entsteht sofort ein Niederschlag. Aus welchem Eiweisskörper dieser Niederschlag besteht, habe ich nicht näher untersucht; wohl aber fand ich, dass eine neutrale Lösung von  $\text{HCl}$ -Histon im Stande war, in einer Lösung von Natriumnucleohiston oder auch in einer Lösung des im Thymusextracte vorhandenen Nucleoproteids einen Niederschlag hervorzurufen.

*Die übrigen im Thymusextracte vorhandenen Eiweisskörper.*

Das von Lilienfeld entdeckte Nucleoprotein wird von Chlorcalcium nur zum kleinsten Theile gefällt. Wenn die Thymusdrüse 12–24 Stunden mit Wasser extrahirt worden ist, kann das Nucleohiston mittelst 0,1%igem  $\text{CaCl}_2$  völlig gefällt werden. Im Filtrate ist dann der grösste Theil des Nucleoproteids gelöst vorhanden und kann daraus mit Essigsäure oder Salzsäure gefällt werden. Nucleohiston ist aber im Filtrate nicht mehr vorhanden, weil die salzsaure oder essigsaure Fällung sich im Ueberschuss dieser Säuren völlig löst; weiter lässt sich von der mit Essigsäure gefällten Substanz

mittelst 0,8%iger HCl kein Histon abspalten; löst man diese Substanz in 0,2%iger HCl, so entsteht bei der Pepsindigestion ein Niederschlag von Nuclein. Der Phosphorgehalt dieses Nucleoproteids beträgt ungefähr 1%; von den Purinbasen konnte ich, ebenso wie beim Nucleohiston, namentlich Adenin daraus erhalten.

Wenn das Nucleohiston mittelst  $\text{CaCl}_2$  gefällt ist, löst sich das im Filtrate befindliche Nucleoproteid oft nur schwierig im Ueberschuss von Essigsäure; dagegen ist es schon in 0,1—0,2%iger HCl vollkommen löslich. Das mit Essigsäure gefällte Nucleoproteid kann in Wasser, unter Zusatz von ein wenig Ammoniak ungefähr bis zur neutralen Reaction, gelöst werden; fällt man nun nochmals mit Essigsäure, so löst sich der Niederschlag viel leichter in Ueberschuss der Säure.

Gebraucht man zur Lösung des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids nicht allzu viel Wasser, so kann mittelst  $\text{CaCl}_2$  wieder ein Theil des Nucleoproteids gefällt werden; beim Nucleohiston genügte ein Gehalt von 0,1% Chlorcalcium zur völligen Präcipitation; das Nucleoproteid wird etwas leichter gefällt, wenn man etwas mehr  $\text{CaCl}_2$ , z. B. bis 0,2%, zusetzt; der Niederschlag ist dann meistens etwas grösser, immerhin aber sehr unvollständig.

Die Löslichkeitsverhältnisse des mittelst  $\text{CaCl}_2$  gefällten Nucleoproteids stimmen ungefähr mit denjenigen des Calcium-nucleohistons überein; der Niederschlag löst sich im Ueberschuss von  $\text{CaCl}_2$  und anderen Salzen und auch in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks. Wenn es bei dieser sehr leicht alkalischen Reaction gelöst ist, so entsteht bei abermaligem Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  nicht von Neuem ein Niederschlag, sondern höchstens eine Opalescenz. Es ergibt sich also, dass das Nucleoproteid bei neutraler Reaction nur zum kleinsten Theile, bei schwach alkalischer Reaction so gut wie gar nicht mehr von Chlorcalcium gefällt wird.

Wenn das Nucleohiston durch zweimalige Fällung aus dem Thymusauszuge bereitet wird, ereignet sich mit dem Nucleoproteid also Folgendes:

gelöst, während der grössste Theil gelöst bleibt; erstens  $\text{CaCl}_2$  das Nucleoprotein immer sehr unvollständig fällt zweitens weil 0,1%  $\text{CaCl}_2$  nicht derjenige Gehalt ist, wie in einer Lösung des Nucleoproteins der möglichst grobe Niederschlag entsteht; wie gesagt, bekommt man mit 0,2%igem  $\text{CaCl}_2$  meistens einen etwas reichlicheren Niederschlag.

Löst man den mit  $\text{CaCl}_2$  hervorgerufenen Niederschlag, welcher also zum allergrössten Theil aus Nucleohiston besteht, in Wasser unter Zusatz von ein wenig verdünntem Ammonium und fällt nochmals mit  $\text{CaCl}_2$ , so bleibt bei dieser geringen alkalischen Reaction auch der Rest des Nucleoproteins gelöst. Im Filtrate findet man dann auch immer ein wenig Nucleoprotein, welches mit Essigsäure oder Salzsäure gefällt werden kann und sich im Ueberschuss dieser Säuren löst.

Mittels zweimaliger Präcipitation mit 0,1%igem  $\text{CaCl}_2$  kann also das Nucleohiston vom Nucleoprotein getrennt werden.

Ein brauchbares Mittel zur Entscheidung der Frage, ob das Nucleohiston vom Nucleoprotein gereinigt ist, bildet die Millon'sche Reaction. Das Nucleoprotein gibt nämlich die Reaction stark, das Nucleohiston dagegen viel schwächer. Der Thymusauszug oder der darin mittelst Essigsäure verursachte Niederschlag geben auch eine starke Reaction. Wenn einmal mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt, so gibt der Niederschlag schon eine viel schwächere Reaction, während diese nach zweimaliger Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  noch etwas vermindert ist. Immer noch gibt das Nucleohiston auch nach dreimaliger Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  oder auch mit 0,9%iger  $\text{NaCl}$  noch eine schwache Millon'sche Reaction. Diese letztere scheint also dem Nucleohiston selbst zuzukommen. Weil übrigens das Nucleohiston die Millon'sche Reaction gibt, so war dies für das Nucleohiston schon von vornherein wahrscheinlich. Auch die Xanthoproteinreaction ist beim Nucleoprotein stärker, als beim Nucleohiston. Das Nucleoprotein unterscheidet sich ferner vom Nucleohiston durch die Adamkiewicz'sche Reaction, es wird diese vom Nucleoprotein gegeben, vom Nucleohiston nicht. Setzt man aber zuvor dem Nucleohiston  $\alpha$ -Naph

zu, so kommt die Adamkiewicz'sche Reaction wohl zu Stande. Gebraucht man an Stelle des  $\alpha$ -Naphthol Thymol, so entsteht eine karminrothe Farbe. Das Nucleohiston gibt also die Reaction von Molisch, allein es enthält zu wenig aromatische Gruppen für das richtige Zustandekommen der Adamkiewicz'schen Reaction; hiermit stimmt überein, dass die Reaction von Millon nur schwach ist beim Nucleohiston, stark beim Nucleoproteid.

Die Asche des mit  $\text{CaCl}_2$  gefällten und durch Auswaschen mit Alkohol von überschüssigem  $\text{CaCl}_2$  gereinigten Nucleoproteids enthält immer eine grosse Menge Calcium, woraus sich ableiten lässt, dass man es hier, sowie beim Nucleohiston, mit einer Calciumverbindung zu thun hat.

Baryumchlorid fällt das Nucleoproteid ebenso wie Calciumchlorid; auch Magnesiumsulfat kann eine Fällung verursachen. Die Alkalisalze bewirken aber in einer Lösung des Nucleoproteids gar keine Fällung; auf dieser letzten Eigenschaft beruht die Trennung des Nucleohistons vom Nucleoproteid, welche von Bang angegeben wurde.

Nach dieser Methode wird die Thymusdrüse vor der Extraction mit Wasser, mit 0,9%iger  $\text{NaCl}$  ausgezogen, worin sich das Nucleoproteid, obwohl mit Opalescenz, löst, während das Nucleohiston ungelöst bleibt.

Man kann aus dem Nucleoproteid, wie auch Bang bemerkt, mittelst 0,8%iger  $\text{HCl}$  kein Histon bekommen; das Nucleoproteid löst sich in der Salzsäure, und beim Stehenbleiben dieser Lösung setzt sich kein Niederschlag von Nuclein ab; durch Verringerung der sauren Reaction mittelst Alkali kann das Nucleoproteid wieder gefällt werden, während der Niederschlag sich in verdünntem Ammoniak löst. Der Niederschlag entsteht schon bei der schwach sauren Reaction, wobei das Nucleoproteid gefällt wird, und enthält also kein Histon.

Wird die Lösung des Nucleoproteids in 0,8% oder 0,2%iger  $\text{HCl}$  dialysirt, so fällt bei schwach saurer Reaction das Nucleoproteid aus und löst sich nicht, wenn im Verlaufe der Dialyse die Reaction neutral wird. Der Niederschlag löst sich in verdünntem Ammoniak; im Filtrate des Niederschlags befindet sich



Weise ist also aus dem Nucleoproteid kein Histon zu erhalten.

Wenn das Nucleoproteid während einiger Zeit in ziemlich starker Säure, z. B. in 5 bis 10<sup>0</sup>/oiger Essigsäure oder 1 bis 2<sup>0</sup>/oiger Salzsäure gelöst aufbewahrt worden ist und darauf mittelst Zusetzung von Ammoniak wieder gefällt wird, so eignet es sich oftmals, dass sich der Niederschlag sogar in Ueberschuss von Ammoniak nicht löst; man möchte meinen, es in diesem Falle mit Histon zu thun zu haben; dennoch ist diese Meinung, wie ich glaube, nicht richtig; erstens ist der Niederschlag auch so gut wie unlöslich in Säuren, weiter entsteht der Niederschlag bei der schwach sauren Reaction, wobei auch das Nucleoproteid gefällt wird, und drittens löst sich die Fällung in Kalilauge weit schwieriger als Histon. Es ergibt sich also, dass das Nucleoproteid von der Säure, worin es gelöst war, derartig verändert wird, dass es nach der Fällung mittelst Verringerung der sauren Reaction nahezu unlöslich geworden ist.

Obwohl also vom Nucleoproteid mittelst 0,8<sup>0</sup>/oiger oder gar stärkerer Salzsäure kein durch Ammoniak fällbares Histon abgespalten werden kann, und überhaupt die Salzsäure keine Spaltung zu bewirken scheint, so ist damit nicht gesagt, dass das Nucleoproteid keinen basischen, dem Histon vergleichbaren Körper enthält. Die Möglichkeit besteht z. B., dass aus dem Nucleoproteid das von Fleroff<sup>1)</sup> entdeckte Parahiston mittelst 2<sup>0</sup>/oiger Schwefelsäure bereitet werden kann. Ich habe dies aber nicht näher untersuchen können.

Durch Sättigung mit Magnesiumsulfat wird das Nucleoproteid gefällt.

Wie bereits erwähnt wurde, hat Malengreau die fractionirte Fällung mit Ammonsulfat verwendet zur Trennung des Nucleoproteids vom Nucleohiston.

Die Resultate Malengreau's weichen in dreierlei Hinsicht erheblich von den meinigen ab.

Bei der Trennung des Nucleohistons vom Nucleoproteid

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 307.

mittelst  $\text{CaCl}_2$  bekommt man eine Menge Nucleoproteid, welche viel geringer ist als diejenige des Nucleohistons (3,5 bis 4 Theile Nucleohiston auf ein Theil des Nucleoproteids); dagegen sind diese Mengen nach der Methode von Malengreau, wenigstens schätzungsweise genommen, gleich gross. Zweitens erhielt Malengreau aus dem Nucleoproteid ein Histon.

Es ist möglich, dass diese beiden Resultate miteinander in Zusammenhang stehen. Malengreau sagt, dass es nicht leicht sei, das Nucleoproteid völlig von Nucleohiston gereinigt zu erhalten; wenn aber bei der Fällung des Nucleoproteids mittelst nahezu halber Sättigung mit Ammonsulfat schon eine Menge von Nucleohiston mitgefällt wird, so wird nicht nur die Menge des Niederschlags grösser sein, als wenn nur das Nucleoproteid gefällt war, sondern es wird auch mittelst 1%iger  $\text{HCl}$  aus dem Niederschlage Histon zu erhalten sein; das Auswaschen des Niederschlages mit Ammonsulfatlösung, welche Malengreau zur weiteren Reinigung anwendet, wird das gefällte Nucleohiston gewiss nicht wieder lösen.

Von dem aus dem Nucleoproteid erhaltenen Histon gibt Malengreau keine genaue Beschreibung; es wurde bereitete mittelst Extraction des Nucleoproteids mit 1%iger  $\text{HCl}$ ; nach 24 Stunden hatte sich eine grosse Menge des Histons gelöst, und es wurde dies sodann aus seiner Lösung mittelst Ammonsulfat gefällt. Da nun das Nucleoproteid in 1%iger  $\text{HCl}$  löslich ist (obwohl es, wie wir sehen werden, durch die Behandlung mit Ammonsulfat an Löslichkeit beträchtlich verliert), so wäre es möglich, dass die in der Salzsäure gelöste Substanz wenigstens theilweise aus Nucleoproteid bestand; hiermit stimmt überein, dass das Histon aus dem Nucleoproteid bei derselben Concentration von Ammonsulfat gefällt wurde, als das Nucleoproteid selbst.

Drittens fand Malengreau den Phosphorgehalt des Nucleoproteids zu etwa 0,5%, während das mittelst  $\text{CaCl}_2$  von dem Nucleohiston getrennte Nucleoproteid ungefähr 1% Phosphor enthält. Welcher Ursache dieser Unterschied zugeschrieben werden muss, ist schwer zu sagen; nur will ich auf Folgendes aufmerksam machen.

Nucleoprotein mit Ammonsulfat fällt,<sup>1)</sup> so löst sich der Niederschlag ziemlich schwer in Wasser; die Lösung ist opalisirend. Fällt man nun nochmals mit Ammonsulfat, so ist der Niederschlag nahezu unlöslich in Wasser und auch in Säuren nur wenig löslich. Dasselbe ereignet sich, falls einmal mit Ammonsulfat gefällt und sodann mit Ammonsulfatlösung ausgewaschen wird. Durch die Behandlung mit Ammonsulfat wird also das Nucleoprotein derartig geändert, dass es seine Löslichkeit grösstentheils eingebüsst hat, und es muss demnach das Auswaschen, welches sonst meistens als ein indifferenten Vorgang betrachtet wird, in diesem Falle als nicht ganz indifferent bezeichnet werden. Es ist nun nicht unmöglich, dass bei dieser Aenderung auch der Phosphorgehalt sich geändert hat. Aus den Ausführungen Bang's muss, wie bemerkt wurde, als wahrscheinlich abgeleitet werden, dass durch Sättigung mit Kochsalz vom Nucleohiston Nucleinsäure abgespalten wird; vielleicht findet ein ähnlicher Vorgang statt, wenn das Nucleoprotein mit Ammonsulfat gefällt wird.

Ich muss an dieser Stelle bemerken, dass auch von Lilienfeld<sup>2)</sup> der Phosphorgehalt des Nucleoproteins ganz niedrig gefunden wurde (0,433%). Auch hier war allerdings das Nucleoprotein in einer ziemlich starken Kochsalzlösung (etwa 10%iger NaCl) gelöst gewesen. Zugleich wird von Lilienfeld angegeben, dass die von ihm erhaltene Substanz unlöslich in Wasser ist, während das von mir erhaltene Nucleoprotein sich im Wasser löst (gemeint werden hier die Alkalisalze des Nucleoproteins). Wie das Ammonsulfat, so scheint also auch das Kochsalz in stärkeren Lösungen sich dem Nucleoprotein gegenüber nicht ganz indifferent zu verhalten.

Lilienfeld vermuthete, dass das Nucleohiston im Kerne der Thymuszellen enthalten war, das Nucleoprotein im Cytoplasma. Der Kern nimmt in diesen Zellen den grössten Raum ein; es ist also nicht unwahrscheinlich, dass im Kerne das

---

<sup>1)</sup> Ich habe hierzu soviel Ammonsulfat zugesetzt, dass die Flüssigkeit zu etwa einem Drittel mit Ammonsulfat gesättigt war.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 475.

Nucleohiston enthalten ist, welches auch die Hauptmasse der Eiweisskörper im Thymusauszuge darstellt.

Nachdem von Calciumchlorid besonders das Nucleohiston gefällt wird, habe ich versucht, ob vielleicht mikroskopisch Aenderungen der Thymuszellen zu beobachten waren, wenn unter dem Deckglase 0,1%iges  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt wurde; es war dies der Fall; der Kern wird nämlich scharf sichtbar und bekommt ein körniges Aussehen. Wird dagegen Wasser zugesetzt, oder auch eine stärkere Salzlösung, so lösen sich die Kerne ganz auf.

Diese Wahrnehmung stimmt also mit der Vermuthung Lilienfeld's überein.

Wird die fein zerhackte Thymusdrüse während kurzer Zeit, z. B. 1 bis 2 Minuten, mit Wasser geschüttelt und darauf sofort die Flüssigkeit abfiltrirt, so findet man im Filtrate nur Nucleoproteid; es weist dies darauf hin, dass das Nucleoproteid in den äussersten Schichten der Thymuszellen, somit im Cytoplasma, vorhanden ist.

Bang meint, dass das Nucleoproteid nicht in den Thymuszellen selbst, sondern in der Intercellularflüssigkeit enthalten sei; wegen der relativ grossen Mengen von Nucleoproteid, welche im Thymusauszuge vorhanden sind, halte ich diese Meinung, wenigstens in Bezug auf die lebendigen Thymuszellen, für unwahrscheinlich.

Wenn aus dem Thymusauszuge das Nucleohiston und das Nucleoproteid entfernt sind, so bleibt in der restirenden Flüssigkeit noch Eiweiss zurück. Um dieses Eiweiss zu erhalten, fällt man das Nucleohiston mit  $\text{CaCl}_2$  und aus dem Filtrate das Nucleoproteid mit Essigsäure; das Filtrat dieses Niederschlags wird sodann neutralisirt mit Ammoniak. (Setzt man zu viel Ammoniak zu, so entsteht ein Niederschlag von Tricalciumphosphat.)

Wird das neutralisirte Filtrat mit Magnesiumsulfat gesättigt, so bekommt man einen geringen Niederschlag, welcher vielleicht ein Globulin darstellt, vielleicht auch nichts anderes ist, als ein Theil des Nucleoproteids, falls die Fällung mit Essigsäure nicht ganz vollständig gewesen war. Wenn der mittelst



wird und darauf dialysirt, so entsteht in der dialysirten Lösung mittelst Essigsäure oder Salzsäure ein Niederschlag, der sich im Ueberschuss der Säure löst.

Durch die Sättigung mit  $\text{MgSO}_4$  wird nicht alles Eiweiss aus der Flüssigkeit entfernt; ein ziemlich grosser Theil bleibt gelöst und stellt wahrscheinlich ein Albumin dar. Diese Albumin und das möglicher Weise vorhandene Globulin entstammen wohl grösstentheils der Inter cellularflüssigkeit. Bancroft erwähnt gleichfalls das Vorhandensein eines Albumins und eines Globulins im Thymusauszuge.

In Bezug auf die relativen Mengen der im Thymusauszuge befindlichen Eiweisskörper habe ich folgende Zahlen erhalten:

160 g Thymusdrüse wurden zweimal mit  $\pm 500$  ccn Wasser extrahirt; dem darauf noch restirenden Thymusgewebe wurde mittelst theilweisen Auspressens der Flüssigkeit die ungefähre Consistenz der feinzerhackten Drüse gegeben; das Gewicht dieses restirenden Antheils betrug 42 g; durch die Extraction hat also das Gewicht um ungefähr 118 g abgenommen.

Aus den beiden Extracten wurden nun erhalten:

Calciumnucleohiston:	9,807 g = 69,4%
Nucleoproteid:	2,644 » = 18,7%
Sonstige Eiweisskörper:	1,685 » = 11,9%.

(Es wurden diese letzteren mittelst Coagulation bei schwach saurer Reaction, allerdings nicht ganz vollständig abgeschieden.)

Man findet also im Ganzen 14,136 g Eiweisskörper in 118 g der Drüse; es enthält demnach die Thymus ungefähr 12% in Wasser lösliche Eiweisskörper.

*Die elementare Zusammensetzung des Nucleohistons und des Nucleoproteids aus den Thymuszellen.*

Da die Analysen Lilienfeld's sich bezogen auf den Niederschlag, welcher mittelst Essigsäure im Thymusauszuge hervorgerufen werden kann, während dieser Niederschlag sowohl das Nucleohiston, als auch das Nucleoproteid enthält

so war zu erwarten, dass die Zahlen, welche für die Zusammensetzung des reinen Nucleohistons gefunden werden sollten, von denjenigen Lilienfeld's abweichen würden. Es war dies thatsächlich der Fall.

Erstens theile ich hier die in Bezug auf das Nucleohiston erhaltenen Resultate mit.

Die Nucleohistonpräparate, welche einer Analyse unterzogen wurden, waren folgender Weise bereitet:

#### A. Calciumnucleohiston.

Aus dem Thymusauszuge gefällt mittelst 0,1%igen  $\text{CaCl}_2$ ; der Niederschlag wurde gelöst in Wasser unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnten Ammoniaks; sodann wurde filtrirt und wieder gefällt mit 0,1%igem  $\text{CaCl}_2$ ; der Niederschlag wurde darauf dreimal mit Alkohol, sodann mit Aether ausgewaschen und schliesslich bei  $110^\circ$  getrocknet.

#### B. Magnesiumnucleohiston.

Aus dem Thymusauszuge gefällt mit 0,2%iger  $\text{MgSO}_4$ . Der Niederschlag wurde gelöst in Wasser unter Zusatz von einer Spur Ammoniak; die Lösung wurde filtrirt und wieder gefällt mit 0,2%iger  $\text{MgSO}_4$ . Der Niederschlag wurde dreimal mit Alkohol, darauf mit Aether ausgewaschen und bei  $110^\circ$  getrocknet.

#### C. Natriumnucleohiston.

Aus dem Thymusauszuge gefällt mittelst Zusatz von Kochsalzlösung bis 0,9%. Der Niederschlag wurde gelöst in Wasser und noch zweimal in derselben Weise mit Kochsalz gefällt. Sodann wurde dreimal mit Alkohol, darauf mit Aether ausgewaschen und der Niederschlag schliesslich bei  $110^\circ$  getrocknet.

#### *Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen.*

##### a) Calciumnucleohiston, Präparat I.

1. 0,4382 g trockene Substanz lieferten:

0,7270 g  $\text{CO}_2$  = 45,25 % C.

0,2530 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 6,41 % H.

1,0345 g trockene Substanz lieferten 0,0725 g Asche; der Aschengehalt dieses Präparates war also 7,008%. Auf die aschenfreie Substanz

48,66% C und 6,90% H.

2. 0,3447 g trockene Substanz lieferte:

0,5735 g  $\text{CO}_2$  = 45,37% C.

0,2042 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 6,59% H.

Auf die aschenfreie Substanz berechnet, findet man: 48,80% C und 7,08% H.

b) Natriumnucleohiston.

0,3744 g trockene Substanz lieferten:

0,6099 g  $\text{CO}_2$  = 44,42% C.

0,2180 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 6,46% H.

0,4015 g trockene Substanz lieferte 0,0369 g Asche; der Aschengehalt war also 9,191%.

Auf die aschenfreie Substanz berechnet, findet man demnach: 48,92% C und 7,12% H.

Der ziemlich hohe Aschengehalt des Calciumnucleohistons muss dadurch erklärt werden, dass das Calcium in der Asche als Calciumsulfat, Calciumphosphat, theilweise vielleicht auch als Calciumcarbonat vorhanden ist. Uebrigens war der Aschengehalt des Nucleohistons, nachdem mittelst Extraction mit Essigsäure das Calcium daran entzogen war, noch 1,719%.

Es war aber wichtig, zu erfahren, ob das für die obenstehenden Analysen gebrauchte Calciumnucleohiston überdies noch freie Aschenbestandtheile, z. B.  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaCl}$  oder Tricalciumphosphat enthielt. Verunreinigung mit  $\text{NaCl}$  oder  $\text{CaCl}_2$  konnte wegen der Bereitungsmethode und des Auswaschens mit Alkohol als ausgeschlossen gelten. Wurde das Präparat mit Alkohol extrahirt, der Alkohol abfiltrirt und bis zur Trockne abgedampft, so konnte nach dem Ausspülen des Abdampfschälchens mit Wasser in diesem Wasser mittelst Kaliumoxalat auch nach 24 Stunden kein Calcium nachgewiesen werden. Der Thymusauszug enthält nach Lilienfeld saure Phosphate; weil der Auszug einigermassen amphoter reagirt, darf man annehmen, dass darin auch neutrale und basische Phosphate vorhanden sind; bei der ersten Präcipitation mittelst  $\text{CaCl}_2$  können letztere gefällt werden; der allergrösste Theil der Phosphate wird aber in dieser Weise entfernt. Wird nun der Niederschlag von Calciumnucleohiston,

der immer einige Flüssigkeit (also auch gelöste Phosphate) und  $\text{CaCl}_2$  enthält, gelöst in Wasser bei sehr schwach alkalischer Reaction, so kann wieder ein geringer Niederschlag von Tricalciumphosphat entstehen. Es wurde deshalb die Lösung vor der zweiten Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  filtrirt. Obwohl es demnach gleichfalls unwahrscheinlich war, dass das Präparat mit Calciumphosphat verunreinigt war, so habe ich dies jedoch auf folgende Weise näher zu ermitteln versucht:

Ungefähr 500 mg der trockenen Substanz wurden gemischt mit 15 ccm. 1%iger Essigsäure. Nachdem das Gemisch einige Zeit gestanden hatte, wurde durch ein aschenfreies Filter filtrirt; das Filtrat wurde alkalisch gemacht mittelst Ammoniak; es entstand dadurch kein Niederschlag; sodann wurde ein wenig Magnesiamixtur zugesetzt. Nach 24 Stunden war nur ein äusserst geringer, völlig unwägbarer Niederschlag entstanden. Die Verunreinigung mit Calciumphosphat konnte also praktisch ausser Betracht gelassen werden. Hiermit stimmt überein, dass der Calciumgehalt dieses Präparates (1,344%), innerhalb der Beobachtungsfehler, übereinstimmend gefunden wurde mit demjenigen des Calciumnucleohistons, welches vor der Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  mittelst Präcipitation durch Essigsäure und nachherigen Auswaschens mit Wasser von Phosphorsäure gereinigt worden war. (Es wurde hierbei 1,341% Ca gefunden, worüber unten Näheres.)

Im Natriumnucleohiston kann nur  $\text{NaCl}$  als Verunreinigung vorkommen, weil das  $\text{NaCl}$  mittelst Auswaschen mit Alkohol nicht genügend entfernt werden kann; einer geringen Menge  $\text{NaCl}$  im Präparate muss es demnach wahrscheinlich zugeschrieben werden, dass der Kohlenstoffgehalt der aschenhaltigen Substanz etwas niedriger gefunden wurde, als beim Calciumnucleohiston; dagegen stimmen die Resultate, wenn auf aschenfreie Substanz berechnet, nahezu überein.

Lilienfeld fand für den Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt des Nucleohistons im Mittel 48,46% C und 7% H.

Obwohl er dies nicht ausdrücklich erwähnt, so geht doch aus seiner Beschreibung hervor, dass die von ihm gefundenen Zahlen auf die aschenhaltige Substanz berechnet sind. Diese



Mittel für das Calciumnucleohiston fand, nämlich 45,51% C und 6,50% H.

Dieser Unterschied kann nicht nur der Verunreinigung des von Lilienfeld verwendeten Präparates mit Nucleoproteid zugeschrieben werden, wenn man in Betracht zieht, dass der Thymusauszug ungefähr vier Gewichtstheile Nucleohiston auf einen Gewichtstheil des Nucleoproteids enthält, während dieses Verhältniss im essigsäuren Niederschlage ungefähr dasselbe sein muss. Nach meinen Bestimmungen enthält das Nucleoproteid 50% Kohlenstoff; berechnet man nun den Kohlenstoffgehalt eines Gemisches von vier Theilen Nucleohiston und einem Theile Nucleoproteid, so findet man 46,25% C, also 2,21% weniger, als von Lilienfeld gefunden wurde. Die Ursachen dieses Unterschieds sind, meines Erachtens, folgende:

Erstens war das von mir verwendete Nucleohiston eine Calciumverbindung, welche also ein etwas höheres Molekulargewicht besitzt, als das von Lilienfeld mit Essigsäure gefällte Nucleohiston; der Kohlenstoffgehalt der Calciumverbindung muss natürlich etwas niedriger sein. Der dadurch hervorgerufene Unterschied kann aber nicht 2,21% betragen, weil der Calciumgehalt des Calciumnucleohistons nur  $1\frac{1}{3}\%$  beträgt; dennoch würde das Nucleohiston, wenn das Calcium demselben entzogen war, ungefähr 0,6% Kohlenstoff mehr enthalten müssen; es wird dadurch der Unterschied von 2,21% auf 1,61% herabgesetzt.

Zweitens besteht die Möglichkeit, dass das von Lilienfeld bereitete Nucleohiston ausser dem Nucleoproteid noch anderes Eiweiss als Verunreinigung enthielt; fällt man nämlich den Thymusauszug mit Essigsäure, so ist die im Filtrate vorhandene Menge Eiweiss nur eine geringe und entspricht ohne Zweifel nicht 11,9% der totalen, im Thymusauszuge befindlichen Menge Eiweiss; bei einer zweiten Fällung mit Essigsäure ist die Menge Eiweiss im Filtrate noch geringer. Der essigsäure Niederschlag reisst also Eiweiss mit und ist nur schwierig davon zu reinigen; es ist nun nicht unmöglich, dass dieses Eiweiss den Kohlenstoffgehalt des Präparates um

ein Geringes beeinflusst hat. Ein unmittelbarer Hinweis, dass bei der Fällung mit Essigsäure mancherlei Substanzen mitgefällt werden, ist darin gegeben, dass auch der braune Farbstoff des Thymusextractes vom essigsauren Niederschlage mitgerissen wird; der Niederschlag wird dadurch bräunlich gefärbt, während das Filtrat wasserhell ist. Dahingegen ist das mittelst  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleohiston weiss und der braune Farbstoff verbleibt im Filtrate. Man kann nun zwar durch die spätere Behandlung mit Alkohol und Aether den braunen Farbstoff vollkommen aus dem essigsauren Niederschlage entfernen, eine Verunreinigung mit Eiweiss wird aber auf diesem Wege gewiss nicht beseitigt werden.

Drittens ist es möglich, dass der Kohlenstoff- und Wasserstoffgehalt von Lilienfeld thatsächlich etwas zu hoch gefunden wurde; eine von mir in einem genau nach der Lilienfeldschen Methode bereiteten Präparate ausgeführte Bestimmung gab als Resultat: 47,18% C und 6,84% H. Der Aschengehalt des Präparates war 2,527% und, auf die aschenfreie Substanz berechnet, findet man also 48,41% C und 7,02% H.

Lilienfeld fand im Mittel 48,46% C und 7% H. Sollte also Lilienfeld seine Zahlen auf die aschenfreie Substanz berechnet haben, welches aber aus seiner Beschreibung nicht hervorgeht, so stimmen die Resultate nahezu völlig überein, andernfalls besteht ein Unterschied von 1,28% C und 0,16% H.

#### *Stickstoffbestimmungen.*

Es wurden diese nach der Kjeldahl'schen Methode ausgeführt. Die Substanz wurde mit 10 ccm. eines Gemisches von 500 ccm. concentrirter Schwefelsäure und 100 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  unter Zusatz eines Tropfens Quecksilbers gekocht. Das Ammoniak wurde aufgefangen in  $\frac{1}{4}$  n- $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Als Indicator beim Titriren diente Methylorange. Es wurden immer dieselben Flüssigkeiten und womöglich davon auch dieselben Mengen benutzt. Drei vorher ausgeführte blinde Versuche führten zu ungefähr demselben Resultate; im Mittel wurde 0,8 ccm.  $\frac{1}{4}$  n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  verbraucht; bei der Angabe der Zahlen des verbrauchten  $\frac{1}{4}$  n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  ist dem Rechnung getragen worden.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

0,4120 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks: 20,1 ccm.  $\frac{1}{4}$  n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Der Stickstoffgehalt war also 17,075 %. Da der Aschengehalt dieses Präparates 7,008 % beträgt, so findet man für den Stickstoffgehalt, auf die aschenfreie Substanz berechnet: 18,363 %.

b. Magnesiumnucleohiston.

0,4583 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks 22,05 ccm.  $\frac{1}{4}$  n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Der Stickstoffgehalt war also 16,839 %,

0,4366 g trockene Substanz lieferten 0,0376 g Asche; der Aschengehalt dieses Präparates war also 8,383 %. Berechnet auf die aschenfreie Substanz, findet man demnach für den Stickstoffgehalt 18,379 %.

Das Magnesiumnucleohiston enthält wahrscheinlich als Verunreinigung eine geringe Menge MgSO<sub>4</sub>, weil dieses Salz bei dem Auswaschen mit Alkohol nicht genügend entfernt wird. Hiermit stimmt überein, dass der Stickstoffgehalt etwas niedriger ist, als beim Calciumnucleohiston gefunden wurde, während die Resultate, berechnet auf die aschenfreie Substanz, nahezu übereinstimmen.

Lilienfeld fand für den Stickstoffgehalt seiner Substanz 16,86 %, also 0,22 % weniger, als für das Calciumnucleohiston gefunden wurde; bei der Beurtheilung dieses Unterschiedes ist wiederum in Betracht zu ziehen, dass das Präparat Lilienfeld's verunreinigt war mit Nucleoproteid, wahrscheinlich auch mit anderem Eiweiss, und weiterhin, dass seine Substanz keine Calciumverbindung war.

*Phosphorbestimmungen.*

Zur Phosphorbestimmung wurde die Substanz nach der von Neumann<sup>1)</sup> angegebenen Methode mit Salpeter- und Schwefelsäure oxydirt. Die freigewordene Phosphorsäure wurde mit Molybdänmischung unter Zusatz von NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> gefällt; der Niederschlag wurde in der gewöhnlichen Weise gelöst und mit Magnesiummischung gefällt, sodann als Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> gewogen.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

1) 0,4069 g trockene Substanz gaben:

0,0550 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 3,775 % P.

2) 0,4067 g trockene Substanz gaben:

0,0529 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 3,633 % P.

1) Archiv f. Anat. u. Physiol. (Physiol. Abth.) 1900, S. 159.

b. Calciumnucleohiston, Präparat II.

0,4071 g trockene Substanz gaben:

0,0560 g  $Mg_3P_2O_7$  = 3,842 % P.

Es ist schon oben gesagt worden, dass der Gehalt des Calciumnucleohistons, Präparat I, an freien Phosphaten nur so äusserst gering war, dass diese Menge ausser Betracht gelassen werden konnte. Dasselbe Resultat wurde in einer ähnlichen Weise für das Calciumnucleohiston, Präparat II, erhalten.

Im Mittel wurde der Phosphorgehalt des Calciumnucleohistons also zu 3,750 % gefunden. Lilienfeld fand für seine Substanz im Mittel 3,025 %; hält man im Auge, dass diese Substanz zu ungefähr  $\frac{1}{5}$  aus Nucleoproteid bestand, welches nach meinen Bestimmungen  $\pm 1\%$  P enthält, so stimmen die von Lilienfeld und von mir gefundenen Resultate gut überein.

*Schwefelbestimmungen.*

Hierzu wurde die Substanz vorher mit Salpetersäure oxydirt, sowie es von Hammarsten<sup>1)</sup> angegeben worden ist; es wurde dabei aber folgende Modification angewendet: An Stelle des Erhitzens der Substanz in einem Becherglase auf dem Wasserbade wurde dieselbe im Kjeldahlkolben mit Salpetersäure über einer kleinen Flamme sanft gekocht, während mittelst fortwährenden Zuträufelnlassens von Salpetersäure dafür gesorgt wurde, dass die Menge Salpetersäure ungefähr constant blieb ( $\pm 10$  ccm.) und also keine Gefahr vorhanden war, dass Schwefelsäure entweichen konnte. Wenn die Oxydation soweit fortgeschritten war, dass sich keine rothen Dämpfe mehr bildeten, wurde die Salpetersäure vorsichtig bis auf 6—7 ccm. abgedampft. Dem Gemisch im Kolben wurde darauf soviel Natriumcarbonat zugesetzt, dass die Reaction alkalisch wurde und die Flüssigkeit eine braune Farbe bekam. Dieselbe wurde sodann im Platintiegel bis zur Trockne abgedampft und der Rückstand über einer Spiritusflamme verbrannt. Die Asche wurde in Wasser gelöst und die Lösung zweimal mit einem grossen Ueberschuss von Salzsäure bis zur Trockne abgedampft. Die Oxydation des Nucleohistons, sowie des Nucleo-

---

1) Diese Zeitschr., Bd. VII, S. 227; Bd. IX, S. 273.

weniger Stunden beendigt werden, wobei die Flüssigkeit nicht spritzt und also keine Unannehmlichkeiten verursacht werden.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

0,8437 g trockene Substanz gaben:

$$0,0308 \text{ g BaSO}_4 = 0,501 \% \text{ S.}$$

b. Calciumnucleohiston, Präparat II.

0,7992 g trockene Substanz gaben:

$$0,0301 \text{ g BaSO}_4 = 0,517 \% \text{ S.}$$

Das Calciumnucleohiston enthält also im Mittel 0,509 % S.

Das Nucleoproteid enthält nach meinen Bestimmungen 1,19 % S. Lilienfeld fand für seine Substanz 0,701 % S; war davon  $\frac{1}{5}$  Nucleoproteid, so stimmen die Resultate vorzüglich überein.

*Calciumbestimmungen.*

Hierzu wurde das Calciumnucleohiston gut gemischt mit 5%iger Essigsäure; nachdem das Gemisch 1 bis 2 Stunden stehen gelassen war, wurde durch ein aschenfreies Filter filtrirt. Das Filter mit der Substanz wurde mit 5%iger Essigsäure ausgewaschen, bis das Filtrat mit Kaliumoxalat auch nach 24 Stunden keine Kalkreaction gab. Es stellte sich heraus, dass dies schon nach zweimaliger Auswaschung der Fall war. Das Filter wurde demnach zweimal mit 5%iger Salzsäure ausgewaschen, während das dritte Waschwasser als Kontrollflüssigkeit benutzt wurde und mit Kaliumoxalat, nachdem die saure Reaction mit Ammoniak abgestumpft worden war, nach 24 Stunden keinen Niederschlag gab. Zur Entscheidung, ob alles Calcium aus der Substanz verschwunden war, wurde dieselbe bei jeder Bestimmung mit dem Filter verbrannt; die Asche wurde mit Salzsäure ausgekocht; nachdem diese Flüssigkeit mit Ammoniak alkalisch gemacht und sodann mit Essigsäure schwach angesäuert worden war, wurde filtrirt; das Filtrat gab mit Kaliumoxalat nach 24 Stunden keinen Niederschlag.

Man hätte das Calciumnucleohiston auch unmittelbar verbrennen können, um darauf den Calciumgehalt der in Salz-

säure gelösten Asche zu bestimmen. Einige in dieser Weise ausgeführte Bestimmungen stimmten jedoch nicht überein; der Calciumgehalt wurde immer zu niedrig gefunden; es muss dies dem Umstande zugeschrieben werden, dass die Asche des Calciumnucleohistons, auch beim längeren Kochen mit Salzsäure, sich nur theilweise löst; ein Theil des Calciums kann also in der Asche unaufgeschlossen und ungelöst bleiben.

a. Calciumnucleohiston, Präparat I.

0,8028 g trockene Substanz gaben:

$$0,0151 \text{ g CaO} = 1,344\% \text{ Ca.}$$

b. Calciumnucleohiston, Präparat II.

0,3991 g trockene Substanz gaben:

$$0,0074 \text{ g CaO} = 1,324\% \text{ Ca.}$$

Es ist bereits darauf hingewiesen worden, dass diese Präparate eine äusserst geringe Menge freies Phosphat, wahrscheinlich Calciumphosphat, enthielten; es schien mir deshalb geboten, noch eine Kontrollbestimmung des Calciumgehalts auszuführen; das Calciumnucleohiston wurde zu diesem Zweck auf folgende Weise bereitet: Der Thymusauszug wurde mit Essigsäure gefällt; der Niederschlag, behufs Entfernung der Phosphorsäure, zweimal mit einer reichlichen Menge Wasser ausgewaschen und darauf in Wasser unter Zusatz von möglichst wenig Ammoniak gelöst; aus dieser Lösung wurde das Nucleohiston gefällt mit  $\text{CaCl}_2$ ; der Niederschlag wurde mit Alkohol ausgewaschen, bis der Waschalkohol kein  $\text{CaCl}_2$  mehr enthielt, und schliesslich unter Aether gebracht und getrocknet. Weil nur einmal mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt wurde, so war in dieser Substanz wahrscheinlich noch ein wenig Nucleoproteid vorhanden; es wird aber gezeigt werden, dass der Calciumgehalt des Nucleoproteids innerhalb der Beobachtungsfehler übereinstimmt mit demjenigen des Nucleohistons, sodass diese geringe Menge Nucleoproteid keinen Fehler verursachen konnte.

Der Calciumgehalt wurde wieder in der oben angegebenen Weise mittelst Extraction mit 5%iger Essigsäure bestimmt.

0,7563 g trockene Substanz gaben:

$$0,0142 \text{ g CaO} = 1,341\% \text{ Ca.}$$

1,344 und 1,324% Ca; es stimmen diese Zahlen also mit dem zuletzt gefundenen Werthe sehr gut überein, so dass die Verunreinigung der beiden Calciumnucleohistonpräparate mit Calciumphosphat zu gering war, um die Bestimmungen zu beeinflussen. Bei der Berechnung ist das Atomgewicht des Calciums zu 40 angenommen worden.

Im Mittel wurde also für den Calciumgehalt gefunden: 1,336% Ca.

#### *Natriumbestimmung.*

Es ist bereits gesagt worden, dass es möglich ist, das mit Essigsäure gefällte Nucleohiston mit Wasser auszuwaschen, bis das Waschwasser neutral reagirt. Mittelst Zusatz von Alkali kann dann der Niederschlag wieder gelöst werden, ohne dass die Reaction alkalisch wird. Wäre die Menge Alkali, z. B. Natronlauge, welche zur Lösung erforderlich war, bekannt, so könnte daraus der Natriumgehalt des Natriumnucleohistons berechnet werden.

Diese Menge habe ich folgender Weise zu bestimmen versucht.

Aus dem Thymusauszuge wurde das Nucleohiston gefällt mit Chlorcalcium; der Niederschlag wurde gelöst in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks und die Lösung wieder mit Essigsäure gefällt, wodurch das Calciumnucleohiston zerlegt und freies Nucleohiston gebildet wird. Dieser Niederschlag wurde mit destillirtem Wasser ausgewaschen, bis die Reaction des Waschwassers neutral geworden war; sicherheitshalber wurde die Lösung nochmals mit einer reichlichen Menge Wasser ausgewaschen, nachdem mit Lackmuspapier keine saure Reaction mehr im Waschwasser nachgewiesen werden konnte. Der Niederschlag wurde sodann in ein gewogenes Becherglas gebracht und mit destillirtem Wasser gemischt bis zu einem Volumen von 225 ccm. Darauf wurde aus einer Burette  $\frac{1}{10}$  n-NaOH zugesetzt unter Umrühren des Gemisches. Zur Beobachtung des Auftretens der alkalischen Reaction diente ein Tropfen Phenolphthalein; die Menge des noch ungelösten Nucleohistons kann als Maass dafür dienen, wieviel Alkali noch zugesetzt werden muss. Die alkalische Reac-

tion wurde sichtbar nach dem Zusatz von 17,3 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-NaOH. Mit empfindlichem Lackmuspapier wurde zugleich noch das Auftreten der alkalischen Reaction kontrollirt. In 225 ccm. des letzten Waschwassers wurde die rothe Farbe mit Phenolphthalein sichtbar nach einem Zusatz von 0,15 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-NaOH; zur Lösung des Nucleohistons waren also verbraucht worden 17,15 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-NaOH. Diese Lösung wurde nun im vorher gewogenen Becherglas bis zur Trockne abgedampft und sodann bei  $110^{\circ}$  bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Aus der Gewichtsvermehrung des Glases ergab sich, dass darin 2,4902 g Natriumnucleohiston vorhanden waren (die geringe Menge, welche in Verlust gerathen war, weil einige Male Lackmuspapier in die Flüssigkeit eingetaucht worden war, sowie das Trockengewicht des Tropfens Phenolphthalein sind ausser Betracht gelassen).

2,4902 g Natriumnucleohiston enthält also soviel Natrium, als vorhanden in 17,15 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-NaOH; es ist das demnach 39,445 mg, woraus hervorgeht, dass das Natriumnucleohiston 1,584% Natrium enthält; dieser Gehalt stimmt überein mit 1,374% Calcium, während bei der direkten Calciumbestimmung 1,336% Ca gefunden wurde.

Die Zusammensetzung des Calciumnucleohistons war also im Mittel:

C = 45,31%; H = 6,50%; N = 17,075%; P = 3,750%; S = 0,509%; Ca = 1,336%.

Da die Calciumbestimmungen sehr gut übereinstimmende Resultate lieferten, so eignen sich dieselben zur Berechnung des Molekulargewichts des Nucleohistons. Setzt man voraus, dass das Nucleohiston ein Atom Calcium enthält, so wird das Molekulargewicht 2987. Aus dem Schwefelgehalte geht aber hervor, dass das thatsächliche Molekulargewicht einem Vielfachen dieser Zahl entsprechen muss; bei einem Molekulargewicht von 5974 stimmt 0,509% S ungefähr überein mit einem Atom Schwefel.

Mit der Zahl 5974 als Grundlage findet man also als empirische Formel des Nucleohistons:





Eisen enthält. In diesem Falle würde nur die Sauerstoffzahl abgeändert werden müssen.

### *Zusammensetzung des Nucleoproteids.*

Die Zusammensetzung des Nucleoproteids weicht erheblich von derjenigen des Nucleohistons ab. Für die Elementaranalyse wurde das Nucleoprotein folgender Weise bereitet.

Nachdem das Nucleohiston mittelst  $\text{CaCl}_2$  aus dem Thymusauszuge gefällt worden war, wurde aus dem Filtrate das Nucleoprotein mittelst Essigsäure gefällt; der Niederschlag wurde mit ungefähr der halben Menge Wasser gemischt, worin derselbe vor der Fällung mit Essigsäure gelöst vorhanden war, und darauf mittelst Zusatz von möglichst wenig Ammoniak gelöst; die Lösung wurde filtrirt. Mittelst  $\text{CaCl}_2$  konnte aus dieser Lösung ein Theil gefällt werden; der Niederschlag wurde abcentrifugirt und mit Alkohol ausgewaschen, bis der Waschkohol kein  $\text{CaCl}_2$  mehr enthielt; sodann wurde dieses Calciumnucleoprotein unter Aether gebracht und getrocknet.

Derjenige Theil des Nucleoproteids, welcher bei der Fällung mit  $\text{CaCl}_2$  gelöst blieb, wurde wieder gefällt mit Essigsäure; der Niederschlag, welcher immer grösser war, als die mit  $\text{CaCl}_2$  hervorgerufene Fällung, wurde mit Alkohol und Aether ausgewaschen und getrocknet.

Es geht aus dieser Bereitungsmethode hervor, dass für eine Verunreinigung der Präparate mit Salzen keine Gefahr vorhanden war.

### *Kohlenstoff- und Wasserstoffbestimmungen.*

#### a) Calciumnucleoprotein, Präparat I.

0,4018 g trockene Substanz gaben:

0,7357 g  $\text{CO}_2$  = 49,93 % C

0,2564 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 7,09 % H.

0,4942 g trockene Substanz lieferten 0,0187 g Asche; der Aschengehalt dieses Präparates war also 3,784 % und auf aschefreie Substanz berechnet findet man: 51,90 % C und 7,37 % H.

b) Calciumnucleoproteid, Präparat II.

0,4076 g trockene Substanz gaben:

$$0,7427 \text{ g CO}_2 = 49,71 \% \text{ C}$$

$$0,2744 \text{ g H}_2\text{O} = 7,48 \% \text{ H.}$$

0,4202 g trockene Substanz lieferten 0,0174 g Asche; der Aschengehalt war also 4,141% und auf die aschenfreie Substanz berechnet findet man: 51,84% C und 7,80% H.

c) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

0,3555 g trockene Substanz gaben:

$$0,6518 \text{ g CO}_2 = 50,00 \% \text{ C}$$

$$0,2315 \text{ g H}_2\text{O} = 7,24 \% \text{ H.}$$

0,4145 g trockene Substanz lieferten 0,0134 g Asche; der Aschengehalt war also 3,233%; somit findet man für die aschefreie Substanz: 51,68% C und 7,48% H.

d) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat II.

0,3875 g trockene Substanz gaben:

$$0,7128 \text{ g CO}_2 = 50,17 \% \text{ C}$$

$$0,2486 \text{ g H}_2\text{O} = 7,12 \% \text{ H.}$$

0,3945 g trockene Substanz lieferten 0,0118 g Asche; der Aschengehalt war also 2,991%; somit findet man für die aschenfreie Substanz: 51,72% C und 7,35% H.

Im Mittel wurde also für das Calciumnucleoproteid gefunden: 49,82% C und 7,29% H.

Das mit Essigsäure gefällte Nucleoproteid enthielt im Mittel: 50,09% C und 7,18% H.

Der Kohlenstoffgehalt des Calciumnucleoproteids war somit etwas niedriger, als derjenige des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids. Es findet das seine Erklärung darin, dass das Calciumnucleoproteid eine Calciumverbindung darstellt, während dieselbe bei dem mit Essigsäure gefällten Nucleoproteide zerlegt worden ist. Dass ein derartiger Unterschied nicht beim Wasserstoffgehalte beobachtet werden kann, muss dem abnorm hohen Wassergehalte der Bestimmung b zugeschrieben werden.

*Stickstoffbestimmungen.<sup>1)</sup>*

a) Calciumnucleoproteid, Präparat I.

0,4085 g trockene Substanz verbrauchten zur Neutralisation des Ammoniaks: 18,5 ccm.  $\frac{1}{4}$  n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Der Stickstoffgehalt war also 15,851%. Berechnet auf die aschenfreie Substanz findet man: 16,476%.

---

1) Ausgeführt, sowie es beim Nucleohiston angegeben worden ist.

0,4071 g trockene Substanz verbrauchen zur Neutralisation des Ammoniaks: 21,5 ccm.  $\frac{1}{4}$  n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Der Stickstoffgehalt war also 16,110 %. Berechnet auf die aschenfreie Substanz findet man: 16,648 %.

Der Stickstoffgehalt des Calciumnucleoproteids ist also etwas niedriger, als derjenige des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids; es entspricht dies somit der Vorstellung, dass ersteres eine Calciumverbindung darstellt.

### *Phosphorbestimmungen.<sup>1)</sup>*

a) Calciumnucleoproteid, Präparat I.

0,9463 g trockene Substanz gaben:

0,0319 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 0,941 % P.

b) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

1,0551 g trockene Substanz gaben:

0,0365 g Mg<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 0,966 % P.

Der Phosphorgehalt des Calciumnucleoproteids muss natürlich etwas niedriger ausfallen, als derjenige des mit Essigsäure gefällten Nucleoproteids. Bei der Berechnung stellt es sich jedoch heraus, dass dieser Unterschied gänzlich innerhalb der Beobachtungsfehler bleibt. Als durchschnittlicher Phosphorgehalt des Nucleoproteids kann also aus den beiden obenstehenden Bestimmungen 0,954 % P angegeben werden.

### *Schwefelbestimmungen.<sup>2)</sup>*

a) Calciumnucleoproteid, Präparat I.

0,7836 g trockene Substanz gaben:

0,0703 g BaSO<sub>4</sub> = 1,232 % S.

b) Mit Essigsäure gefälltes Nucleoproteid, Präparat I.

0,8486 g trockene Substanz gaben:

0,0706 g BaSO<sub>4</sub> = 1,145 % S.

Ebenso wie bei den Phosphorbestimmungen bleibt auch hier der Unterschied, welcher theoretisch zwischen dem Schwefelgehalte des Calciumnucleoproteids und demjenigen des mit

---

1) Ausgeführt, sowie es beim Nucleohiston angegeben worden ist.

2) Ausgeführt, sowie es beim Nucleohiston angegeben worden ist.

Essigsäure gefällten Nucleoproteids bestehen muss, gänzlich innerhalb der Beobachtungsfehler.

Im Mittel kann also der Schwefelgehalt des Nucleoproteids zu 1,188% angegeben werden.

### *Calciumbestimmungen.*

Zur Bestimmung des Calciumgehalts wurde das Nucleoprotein im Porzellantiegel verbrannt. Die Asche löste sich leicht beim Kochen mit Salzsäure. Die Flüssigkeit wurde nun mit Ammoniak alkalisch gemacht, sodann schwach mit Essigsäure angesäuert; darauf wurde filtriert und das Filter mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Das Calcium wurde mit Kaliumoxalat gefällt und als CaO gewogen.

a) Calciumnucleoprotein, Präparat I.

0,4942 g trockene Substanz gaben:

0,0092 g CaO = 1,330% Ca.

b) Calciumnucleoprotein, Präparat II.

0,4202 g trockene Substanz gaben:

0,0079 g CaO = 1,343% Ca.

Im Mittel wurde also gefunden: 1,337% Ca.

Diese Zahl stimmt nahezu völlig überein mit derjenigen, welche beim Calciumnucleohiston erhalten wurde, nämlich 1,336%.

Für die Zusammensetzung des Calciumnucleoproteids wurde also im Mittel gefunden:

C = 49,82%, H = 7,29%, N = 15,851%, P = 0,954%,

S = 1,188%, Ca = 1,337%.

Der Calciumgehalt kann auch hier wieder zur Berechnung des Molekulargewichts verwendet werden. Enthält das Nucleoprotein ein Atom Calcium, so findet man, als Minimalzahl, 2980. Dieser Zahl entsprechen ungefähr ein Atom Schwefel und ein Atom Phosphor.

Mit der Zahl 2980 als Grundlage findet man also als empirische Formel des Nucleoproteids:



---

1) In Bezug auf möglich im Molekül vorhandenes Eisen gilt das beim Nucleohiston Gesagte.

# Zusammenstellung der Analysenzahlen.

## Nucleohiston.

Aschenhaltige Substanz								Aschenfreie Substanz		
	C	H	N	P	S	Ca	Na	C	H	N
Ca-Nh. I . . .	45,25 45,37	6,41 6,59	17,075 —	3,775 3,633	0,501 —	1,344 —	— —	48,66 48,80	6,90 7,08	18,363 —
Ca-Nh. II . .	—	—	—	3,842	0,517	1,324	—	—	—	—
Ca-Nh. III . .	—	—	—	—	—	1,341	—	—	—	—
Na-Nh. . . .	44,42	6,46	—	—	—	—	1,584	48,92	7,12	—
Mg-Nh. . . .	—	—	16,839	—	—	—	—	—	—	18,379

## Nucleoproteid.

Aschenhaltige Substanz							Aschenfreie Substanz		
	C	H	N	P	S	Ca	C	H	N
Ca-Np. I . . . . .	49,93	7,09	15,851	0,941	1,232	1,330	51,90	7,37	16,476
Ca-Np. II . . . . .	49,71	7,48	—	—	—	1,343	51,84	7,80	—
Essigs. Np. I . .	50,00	7,24	16,110	0,966	1,145	—	51,68	7,48	16,648
Essigs. Np. II . .	50,17	7,12	—	—	—	—	51,71	7,35	—

### *Die Wirkung des Nucleohistons und des Nucleoproteids als Fibrinferment.*

Von Lilienfeld wird angegeben, dass das mit Essigsäure gefällte Nucleohiston Fibrinogen enthaltende Flüssigkeiten nicht zur Gerinnung zu bringen vermag. Wohl aber kann nach ihm das Nucleohiston vom Fibrinogen Thrombosin abspalten, welches sich mit Calcium- oder Baryumsalzen verbindet und dadurch in Fibrin übergeht.

Nachdem aber Hammarsten<sup>1)</sup> dargethan hatte, dass Fibrin keine Calciumverbindung darstellt, und Cramer<sup>2)</sup> die

1) Diese Zeitschr., Bd. XXII, S. 333; Bd. XXVIII, S. 98.

2) Diese Zeitschr., Bd. XXIII, S. 74.

Identität von Thrombosin mit Fibrinogen erwiesen hatte, konnte man es als gesichert betrachten, dass die Calciumsalze nicht in der von Lilienfeld angegebenen Weise die Gerinnung beeinflussen.

Andererseits hatten Arthus und Pagès gezeigt, dass Calciumsalze zur Gerinnung erforderlich waren.

Schon bevor Lilienfeld seine Gerinnungstheorie aufgestellt hatte, war von Pekelharing<sup>1)</sup> gefunden worden, dass die Kalksalze zur Bildung des Fibrinferments aus dem Zymogen erforderlich waren. Er fasste das Ferment als eine Kalkverbindung des Zymogens auf und wies nach, dass das Zymogen aus dem Blute ein Nucleoproteid war. Sodann zeigte er, dass auch andere Nucleoproteide, u. A. die mittelst Essigsäure aus dem Thymusauszuge gefällte Substanz, mit Hülfe von Kalksalzen Gerinnung hervorzurufen im Stande waren, ohne Kalksalze aber das Fibrinogen nicht merkbar änderten. Das in der Thymus enthaltene Zymogen schien also auch wieder, indem es sich mit Calcium verband, in Ferment übergehen zu können.

Die Meinung, dass die Nucleoproteide des Thymusauszuges sich mit Calcium zu verbinden vermögen, kann nach dem im Vorhergehenden Gesagten nicht mehr bezweifelt werden. Wie schon bemerkt wurde, war von Pekelharing gefunden worden, dass diese Verbindung Gerinnung hervorrufen kann.

Bei einer Wiederholung dieser Versuche, welche ich unternahm, um die Bedeutung der Calciumsalze näher kennen zu lernen, stellte es sich heraus, dass für die Wirksamkeit der Nucleoproteide der Thymusdrüse ein bestimmter Gehalt an Calciumsalz als Optimum zu betrachten ist.

Zum Beweise mögen folgende Versuche aufgeführt werden: Es wurden in einem Reagensröhrchen immer 2 ccm. des Thymusauszuges gemischt mit 4 ccm. der Fibrinogenlösung, welche mit  $\text{CaCl}_2$  für sich allein nicht gerann; sodann wurden verschiedene Mengen  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt. Immer wurden derselbe Thymusauszug und dieselbe Fibrinogenlösung benutzt. Die Gemische wurden im Wasserbade bei  $37^\circ$  gehalten.

---

<sup>1)</sup> Untersuchungen über das Fibrinferment. Amsterdam 1892.

- |   |   |  |
|---|---|--|
| a) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen  | } | Keine Gerinnung.   |
| b) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen<br>2 Tropfen 1% $\text{CaCl}_2$<br>(1 Tropfen = 0,06 ccm.) |   |  |
| c) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen<br>1 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$                           | } | Vollständige Gerinnung nach<br>1½ Stunden.   |
| d) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen<br>3 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$                           |   |  |
| e) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen<br>5 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$                           | } | Nach 3 Stunden war das Gemisch<br>noch flüssig; nach $\pm$ 18 Stunden<br>hatte sich ein nicht sehr festes<br>Gerinnsel gebildet. |
| f) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen<br>8 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$                           |   |  |
| g) 2 ccm. des Extractes<br>4 ccm. Fibrinogen<br>12 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$                          | } | Das Gemisch bleibt flüssig.  |
|   |   |  |

Dass es in den letzten zwei Fällen nicht die Erhöhung des Salzgehaltes war, welche die Gerinnung verhinderte, erhellt noch aus folgendem Versuche.

- |   |   |                                 |
|---|---|---------------------------------|
| 2 ccm. des Extractes                    | } | Gerinnung nach $\pm$ 3 Stunden. |
| 4 ccm. Fibrinogen                       |   |                                 |
| 1 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$           |   |                                 |
| 4 Tropfen gesättigter<br>Kochsalzlösung |   |                                 |

Aus dem Volumen der verwendeten Gemische und den bekannten Mengen  $\text{CaCl}_2$ , welche zugesetzt wurden, kann berechnet werden, dass die Gerinnung mittelst des Thymusauszuges am besten und am raschesten stattfindet bei einem Gehalt von 0,1 bis 0,3%  $\text{CaCl}_2$ , dass fernerhin die Gerinnung bei einem Gehalt von  $\pm$  0,5%  $\text{CaCl}_2$  erheblich verzögert wird und bei einem Gehalt von  $\pm$  0,8%  $\text{CaCl}_2$  ganz unterbleibt.

Zu den erwähnten Versuchen wurde der unveränderte Thymusauszug benutzt; ich habe nun auch für das Nucleohiston und das Nucleoproteid die Fähigkeit, Gerinnung hervor-

zurufen, für sich gesondert untersucht. Ueberdies habe ich mich davon überzeugt, dass die Eiweisskörper, welche ausser dem Nucleohiston und dem Nucleoproteid im Thymusauszuge vorhanden sind, keine die Gerinnung hemmende oder fördernde Eigenschaften besitzen.

Wird das Nucleohiston zweimal gefällt mit 0,1%igem  $\text{CaCl}_2$ , und eine geringe Menge des Niederschlages mit einigen Cubikcentimetern Fibrinogen gemischt, so löst sich das Nucleohiston wegen des Kochsalzgehaltes des Fibrinogens und nach einiger Zeit tritt die Gerinnung auf; auch hier aber zeigt es sich wiederum, dass die Gerinnung rascher und vollständiger stattfindet, wenn das Gemisch ungefähr 0,1%  $\text{CaCl}_2$  enthält.

Die zuverlässigste Methode zur Bereitung von Fibrinferment aus Nucleohiston ist also wohl diese, dass man das Nucleohiston mit 0,1%  $\text{CaCl}_2$  fällt, sodann eine geringe Menge des Niederschlages mit der Fibrinogenlösung mischt und darauf soviel  $\text{CaCl}_2$  zusetzt, bis das Gemisch  $\pm$  0,1%  $\text{CaCl}_2$  enthält. (Die geringe Menge  $\text{CaCl}_2$ , welche zugleich mit dem Nucleohiston in das Gemisch eingeführt wird, kann, wenn wenigstens nicht allzu viel Nucleohiston gebraucht wird, vernachlässigt werden.)

Wenn man das Nucleohiston aus dem Thymusauszuge mittelst  $\text{CaCl}_2$  entfernt, sodann aus dem Filtrate das Nucleoproteid mit Essigsäure fällt und den Niederschlag mit möglichst wenig Ammoniak löst, so vermag diese Lösung mit Hilfe von Calciumsalzen Gerinnung hervorzurufen; ein Gehalt von  $\pm$  0,1%  $\text{CaCl}_2$  ist auch hier als Optimum zu betrachten.

Das mittelst 0,2%  $\text{MgSO}_4$  oder 0,9%  $\text{NaCl}$  gefällte Nucleohiston vermag ohne Zusatz von Kalksalzen keine Gerinnung hervorzurufen.

Aus dem Obenstehenden geht demnach hervor, dass der Thymusauszug und die darin enthaltenen Nucleoproteide als Fibrinferment am wirksamsten sind, wenn die Gerinnungsflüssigkeit 0,1 bis 0,3%  $\text{CaCl}_2$  enthält; es ist das gerade diejenige Concentration des Chlorcalciums, durch welche das Nucleohiston vollständig, das Nucleoproteid wenigstens möglichst vollständig, aus einer übrigens salzfreien Lösung gefällt werden;



Gehalt von 0,5%, derjenigen Concentration also, bei welcher das Nucleohiston gerade noch ungelöst bleibt oder vielleicht schon sich zu lösen anfängt. Bei einem Gehalt von  $\pm 0,8\%$  oder mehr  $\text{CaCl}_2$  findet keine Gerinnung statt; bei diesem Gehalt wird das Nucleohiston in einem übrigens salzfreien Gemische wenigstens theilweise wieder gelöst.

Von Pekelharing wurde das Fibrinferment aus Rinderblutserum bereitet, mittelst Verdünnung desselben mit Wasser und nachheriger Fällung mit Essigsäure. Es wurde soviel Essigsäure zugesetzt, dass das Serumglobulin sich wieder löste; das Zymogen des Ferments, ein Nucleoproteid, bleibt dann noch gefällt und kann in Wasser mit einer Spur Alkali gelöst werden.

Ich habe untersucht, ob aus der so erhaltenen Lösung das Nucleoproteid mittelst  $\text{CaCl}_2$  gefällt werden kann; es war dies der Fall; ebenso wie das Nucleohiston, wird das Nucleoproteid aus Blutserum am besten bei einem Gehalt von 0,1%  $\text{CaCl}_2$  gefällt.<sup>1)</sup> Der Niederschlag ist in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen von verdünntem Ammoniak löslich. Aus dieser Lösung kann das Nucleoproteid wieder mittelst  $\text{CaCl}_2$  gefällt werden. Der Niederschlag löst sich in 0,2% iger  $\text{HCl}$  und gibt bei der Behandlung mit Pepsin und Salzsäure nach etwa 48 Stunden einen allerdings nicht sehr grossen Niederschlag.

Zur Untersuchung, ob die mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Substanz Phosphor enthielt und ob dieselbe eine Calciumverbindung darstelle, habe ich dieselbe auf folgende Weise bereitet.

Rinderblutserum wurde mit zwei Volumina Wasser verdünnt; sodann wurde das Nucleoproteid mit Essigsäure gefällt und der Niederschlag in Wasser mit möglichst wenig Ammoniak gelöst. Die Lösung wurde filtrirt und aus dem Filtrate das Nucleoproteid durch  $\text{CaCl}_2$  gefällt, der Niederschlag wurde in Wasser unter Zusatz von ein Paar Tropfen verdünnten Ammoniaks gelöst, die Lösung filtrirt und das Filtrat wieder mit  $\text{CaCl}_2$  gefällt. Darauf wurde der Niederschlag mit Alkohol

---

1) Diese Fällung ist aber nicht vollständig.

ausgewaschen, bis der Waschalkohol kein  $\text{CaCl}_2$  mehr enthielt, sodann unter Aether gebracht und getrocknet.

Diese Substanz wurde mit Kaliumnitrat und Natriumcarbonat verascht; in der Asche konnte Phosphor nachgewiesen werden. Der Phosphorgehalt scheint aber gering zu sein.

In Bezug auf den Calciumgehalt erhielt ich folgendes Resultat:

0,4802 g trockene Substanz wurden verbrannt; das Gewicht der Asche betrug 0,0089 g, der Aschengehalt somit 1,853%. Die Asche löste sich vollständig beim Kochen mit Salzsäure und lieferte 0,0043 g  $\text{CaO}$ . Der Calciumgehalt war also 0,639%.

Von Hammarsten<sup>1)</sup> ist angegeben worden, dass das Serumglobulin aus seiner neutralen, wässrigen Lösung von sehr geringen Salzmengen gefällt wird, um sich dann im Ueberschusse zu lösen. Ein derartiges Verhalten wurde hier für das Nucleoproteid gefunden. Die Mittheilungen Hammarsten's wurden aber gemacht, bevor die Untersuchungen Pekelharing's die Existenz eines Nucleoproteids im Blutserum nachgewiesen hatten. Es ist nun allerdings möglich, dass auch das Serumglobulin von geringen Salzmengen gefällt wird, und in diesem Falle wäre die von mir erhaltene Substanz nicht als reines Nucleoproteid zu betrachten, weil die Trennung vom Globulin mittelst einmaliger Fällung mit Essigsäure nicht vollständig ist. Dass jedoch diese Substanz Nucleoproteid enthält, erscheint mir nach dem oben Gesagten sicher gestellt.

In Ueberschuss von  $\text{CaCl}_2$  löst sich das mit  $\text{CaCl}_2$  gefällte Nucleoproteid aus Blutserum etwas leichter, als das Nucleohiston. Die Lösung beginnt nämlich bereits bei einem Gehalte von 0,3 bis 0,4%  $\text{CaCl}_2$ , während bei einem Gehalt von 0,8%  $\text{CaCl}_2$  die Lösung eine vollständige ist.

$\text{BaCl}_2$  und  $\text{MgSO}_4$  vermögen, ebenso wie  $\text{CaCl}_2$ , das Nucleoproteid zu fällen. Auch durch  $\text{NaCl}$  wird ein Niederschlag hervorgerufen.

---

<sup>1)</sup> Pflüger's Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 18, S. 38, 1880.

wird von dem Gehalte an Calciumsalzen in derselben Weise beeinflusst, wie es beim Nucleohiston gefunden wurde.

Folgender Versuch wird dies näher erweisen:

900 ccm. Rinderblut wurden in 100 ccm. 10%igem  $\text{CaCl}_2$  aufgefangen; das Blut blieb flüssig; der Gehalt an  $\text{CaCl}_2$  war ungefähr 1%. Die totale Menge Salz im Blute betrug demnach  $\pm 1,9\%$ . Bei diesem Salzgehalte vermag übrigens das Blut noch sehr wohl zu gerinnen. Sicherheitshalber wurden aber 900 ccm. Blut desselben Rindes in 30 ccm. gesättigter Kochsalzlösung, welche mit Wasser bis auf 100 ccm. angefüllt waren, aufgefangen. Dieses Blut gerann in der gewöhnlichen Weise, obgleich der Salzgehalt ebenso gross war, wie derjenige des in Chlorcalciumlösung aufgefangenen Blutes. Von letzterem wurden nun die Blutkörperchen abcentrifugirt. Auf diese Weise wurde ein  $\text{CaCl}_2$ -Plasma erhalten, welches spontan nicht gerann, wohl aber nach Verdünnung mit Wasser. Eine übrigens wirksame Lösung von Schmidt's Ferment rief im  $\text{CaCl}_2$ -Plasma keine Gerinnung hervor.

Mitteltst Zusatz von verschiedenen Mengen Wasser zum Plasma in Reagensröhrchen, wurde nun die geringste Verdünnung gesucht, bei welcher das Plasma noch gerann. Die Röhrchen wurden ins Wasserbad bei  $37^\circ$  gestellt.

- |    |                |  |
|----|----------------|--|
| a. | 3 ccm. Plasma  | } Keine Gerinnung.                               |
|    | 1 ccm. Wasser  |  |
| b. | 3 ccm. Plasma  | } Schwache Gerinnung nach $\pm 14$ Stunden.      |
|    | 2 ccm. Wasser  |  |
| c. | 3 ccm. Plasma  | } Ziemlich gute Gerinnung nach $\pm 14$ Stunden. |
|    | 3 ccm. Wasser  |  |
| d. | 3 ccm. Plasma  | } Vollständige Gerinnung nach $\pm 14$ Stunden.  |
|    | 6 ccm. Wasser  |  |
| e. | 3 ccm. Plasma  | } Vollständige Gerinnung nach einer Viertel-     |
|    | 9 ccm. Wasser  |  |
| f. | 3 ccm. Plasma  | } Vollständige Gerinnung nach einer Viertel-     |
|    | 12 ccm. Wasser |  |

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die Grenze der Verdünnung, bei welcher das Plasma noch gerinnt, liegt zwischen 1 und 2 ccm. Wasser auf 3 ccm. Plasma, also bei

einem Gehalt von ungefähr 0,75 bis 0,6%  $\text{CaCl}_2$ , während bei einem Gehalt von 0,25 bis 0,2%  $\text{CaCl}_2$  sehr rasch Gerinnung eintritt.

Auch hier stellt es sich heraus, dass die Gerinnung am raschesten und am besten erfolgt bei demjenigen Gehalt an  $\text{CaCl}_2$ , bei welchem das Nucleoproteid aus dem Blutserum aus einer übrigens salzfreien Lösung gefällt wird. Bei einem Gehalt von 0,75%  $\text{CaCl}_2$ , bei welchem das mittelst Chlorcalcium gefällte Nucleoproteid nahezu ganz gelöst ist, unterbleibt die Gerinnung.

Man hat bezweifelt, ob das Fibrinferment thatsächlich ein Nucleoproteid ist, und gemeint, dass es vielleicht eine Substanz war, welche dem Nucleoproteid als fortwährende Verunreinigung beigemischt war. Aus den obenstehenden Versuchen geht hervor, dass sowohl das Nucleohiston, als das Nucleoproteid aus Blutserum kleineren und grösseren Mengen  $\text{CaCl}_2$  gegenüber sich in einer Weise verhalten, welche sich vollkommen vergleichen lässt mit dem Verhalten des Fibrinferments gegen kleinere oder grössere Mengen  $\text{CaCl}_2$ .

Enthalten die Lösungen von Nucleohiston oder von Nucleoproteid keine Calciumsalze, so vermögen sie keine Gerinnung hervorzurufen. Bei einem sehr geringen Gehalt an  $\text{CaCl}_2$  werden sie theilweise gefällt und verursachen eine langsame oder unvollständige Gerinnung; bei einem etwas höheren Gehalt an  $\text{CaCl}_2$ , nämlich 0,1 bis 0,3%, werden sie am vollständigsten gefällt und es entsteht rasch eine vollkommene Gerinnung. Bei einem Gehalt von 0,5 bis 0,6%  $\text{CaCl}_2$  bleibt das Nucleohiston gerade noch gefällt oder es fängt vielleicht schon an, sich zu lösen, während das Nucleoproteid zu einem grossen Theile gelöst ist; die Gerinnung findet nun wiederum langsam statt. Bei einem Gehalt von 0,8%  $\text{CaCl}_2$  ist das Nucleoproteid vollständig, das Nucleohiston wenigstens zu einem grossen Theile gelöst und die Gerinnung unterbleibt gänzlich.

Fängt man das Blut in einer Chlorcalciumlösung auf, um durch Verdünnung zu ermitteln, bei welchem Gehalt an  $\text{CaCl}_2$  die Gerinnung noch gerade stattfindet, so ist es nöthig, die Versuche mit dem  $\text{CaCl}_2$ -Plasma auszuführen. Wird näm-

dasselbe ungefähr 1%  $\text{CaCl}_2$  enthält, so bleibt es etwa 12 bis 24 Stunden flüssig, gerinnt aber schliesslich doch. Dieses Verhalten muss wahrscheinlich daraus erklärt werden, das allmählich mehr Nucleoproteid aus den Blutkörperchen sich löst, wodurch die Bildung von Ferment gefördert wird.

Verwendet man zu den Gerinnungsversuchen das nicht von den Blutkörperchen getrennte Blut, so kann nur gezeigt werden, dass die Gerinnung des verdünnten Blutes schneller verläuft, als diejenige des unverdünnten Blutes.

Von Pekelharing wurde gezeigt, dass im spontan nicht gerinnenden verdünnten Magnesiumsulfatplasma nach Zusatz von Fibrinferment, also der Calciumverbindung des Nucleoproteids, Gerinnung eintrat. Er folgerte hieraus, dass im  $\text{MgSO}_4$ -Plasma kein Ferment vorhanden sei; wenn das Blut in  $\text{MgSO}_4$ -Lösung aufgefangen wurde, so ward nach ihm das freiwerdende Nucleoproteid durch das Magnesiumsulfat verhindert, sich mit Calcium zu verbinden. Diese Ansicht wird noch näher durch die oben erwähnte Beobachtung bestätigt, dass das Nucleoproteid aus dem Blutserum durch  $\text{MgSO}_4$  ebenso gut gefällt wird, als durch  $\text{CaCl}_2$ , dass also die Magnesiumverbindung ebenso leicht gebildet wird, als die Calciumverbindung.

Man muss sich demnach vorstellen, dass beim Auffangen des Blutes in einer Magnesiumsulfatlösung wegen des grossen Ueberschusses von  $\text{MgSO}_4$ , der minimalen Menge Calciumsalz im Blute gegenüber, nur die Magnesiumverbindung des Nucleoproteids gebildet wird, welche Verbindung keine Fermentwirkung besitzt.

Falls diese Ansicht richtig ist, muss auch  $\text{BaCl}_2$  die Gerinnung des Blutes verhindern können und muss das  $\text{BaCl}_2$ -Plasma auch nach der Verdünnung desselben nicht gerinnen. Es ist dies nun thatsächlich der Fall. Schon vor einigen Jahren sind von Horne<sup>1)</sup> Versuche angestellt worden, namentlich über den die Gerinnung hemmenden Einfluss grösserer

---

1) Journal of Physiology, vol. XIX, p. 356.

dass Baryum-, Strontium- und Calciumchlorid die Gerinnung des Blutes hemmten oder verhinderten, falls das Blut einen Gehalt von 0,5% oder grösseren Mengen dieser Salze enthielt. Horne benutzte bei seinen Versuchen das Blut selbst, nicht das daraus zu erhaltene Plasma. Man sieht, dass der von ihm angegebene Gehalt von 0,5% Erdalkalisalz, welcher die Gerinnung hemmt, wenigstens in Bezug auf das Chlorcalcium, sehr gut mit meinen Resultaten übereinstimmt, woraus desgleichen hervorgeht, dass bei einem Gehalt von 0,5%  $\text{CaCl}_2$  die Gerinnung stark verzögert wird.

Hinsichtlich der Wirkung des Baryumchlorids habe ich noch folgenden Versuch angestellt:

Ein Liter Blut wurde in 100 ccm. einer gesättigten Baryumchloridlösung aufgefangen. Das Blut gerann nicht. Nachdem die Blutkörperchen abcentrifugirt worden waren, konnte das  $\text{BaCl}_2$ -Plasma verdünnt werden, ohne dass Gerinnung auftrat.

Mittelst Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  zum verdünnten  $\text{BaCl}_2$ -Plasma konnte die Gerinnung hervorgerufen werden, ebenso wie dies auch beim verdünnten  $\text{MgSO}_4$ -Plasma der Fall ist.

Es stellte sich heraus, dass auch im verdünnten  $\text{BaCl}_2$ -Plasma die Gerinnung am raschesten und am vollständigsten vor sich geht, wenn das Gemisch 0,1 bis 0,4%  $\text{CaCl}_2$  enthält. Folgende Versuche, wobei die Reagenzröhrchen wiederum in ein Wasserbad von 37° gestellt wurden, werden dies näher erweisen:

a.	3 ccm. Plasma	}	Keine Gerinnung.
	12 ccm. Wasser		
b.	3 ccm. Plasma	}	Sehr schwache Gerinnung nach ± 18 Stunden.
	12 ccm. Wasser		
	6 Tropfen 1% $\text{CaCl}_2$ (1 Tropfen = 0,06 ccm.)		
c.	3 ccm. Plasma	}	Ziemlich gute Gerinnung nach ± 18 Stunden.
	12 ccm. Wasser		
	1 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$		
d.	3 ccm. Plasma	}	Vollständige Gerinnung nach ± 20 Minuten.
	12 ccm. Wasser		
	3 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$		

12 ccm. Wasser	}	vorhandene Gerinnung nach
10 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$		$\pm 18$ Stunden.
f. 3 ccm. Plasma	}	Keine Gerinnung.
12 ccm. Wasser		
20 Tropfen 10% $\text{CaCl}_2$		

Dass das verdünnte  $\text{BaCl}_2$ -Plasma nach dem Zusatz von  $\text{CaCl}_2$  gerinnt, muss wahrscheinlich dem Umstande zugeschrieben werden, dass das Calcium nun nicht mehr dem Baryum gegenüber in so verschwindenden Mengen vorhanden ist. Es wird vielleicht theilweise das Baryum aus seiner Verbindung mit dem Nucleoproteid verdrängen können und damit ist das Ferment gebildet. Selbst die sehr kleinen Mengen Calciumsalz im normalen Blute scheinen eine derartige Wirkung auszuüben. Ich habe wenigstens bemerkt, dass bisweilen auch im verdünnten  $\text{BaCl}_2$ -Plasma z. B. nach 24 Stunden ein sehr schwaches Gerinnsel gebildet werden kann. Enthält das verdünnte  $\text{BaCl}_2$ -Plasma mehr als 0,5%  $\text{CaCl}_2$ , so wird durch diesen Gehalt, ebenso wie beim normalen Blute, die Gerinnung gehemmt.

Hammarsten hat in Bezug auf die Beeinflussung der Gerinnung mittelst  $\text{CaCl}_2$  mit den meinigen in Einklang stehende Beobachtungen mitgetheilt.<sup>1)</sup> Dieser Forscher führte aber seine Versuche mit reinen Fibrinogenlösungen aus und hat geringere Mengen von Kalksalzen verwendet, so dass die Gerinnung nur verzögert, nicht aber, wie in meinen Versuchen mit Blutplasma, ganz hintangehalten wurde.

1) Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 104.

# **Ueber das Protamin aus den Spermatozoen des Accipenser stellatus.**

Von

Privatdocent Dr. **D. Kurajeff.**

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Laboratorium bei der militär-medicinischen  
Akademie zu St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 18. Januar 1901.)

---

Die bisher beschriebenen Protamine können in zwei Gruppen, nämlich die des Salmins (Salmin, Clupein und Scombrin) und die des Sturins (Sturin), welche sich von einander nach ihrer chemischen Zusammensetzung sehr scharf unterscheiden, eingetheilt werden. Das Interesse für diese eigenartigen Substanzen, welches durch die Untersuchungen von Prof A. Kossel hervorgerufen wurde, ruft das Bestreben hervor, noch andere Protamine aus dem Sperma möglichst verschiedener Fische zu gewinnen und zu untersuchen. In letzter Zeit ist es mir gelungen, das Vorkommen von echten Protaminen in den reifen Spermatozoen des Hechtes, des Welses (Silurus Glanis) und des Accipenser stellatus zu constatiren.

Die Menge des zu meiner Verfügung stehenden Spermas des Hechtes und des Welses war leider sehr gering, so dass ich eine nähere Untersuchung der Protamine dieser Fische bis auf die Beschaffung einer genügenden Quantität des Spermas verschieben muss. Was aber das Protamin des Accipenser stellatus anlangt, so möchte ich hier die von mir darüber erhaltenen Thatsachen vorläufig mittheilen. Das Sperma des Welses und des Accipenser stellatus habe ich durch die Hülfe des Herrn Prof. O. Grimm, dem ich auch hier meinen besten Dank aussprechen möchte, aus Baku (Kaukasus) bekommen.

Die Spermatozoen aus den Testikeln des Welses und des Accipenser stellatus wurden während der Laichzeit (Mai, 1900) nach der gewöhnlichen von F. Miescher angegebenen Methode erhalten. Die weitere Behandlung der Spermatozoen



Die Spermatozoenmasse des *Accipenser stellatus* wurde zuerst durch Extraction mit heissem Alkohol und Aether fettfrei gemacht und dann mit ca. 1%iger Schwefelsäure wiederholt extrahirt. Bei der Fällung des sauren Extractes mit Alkohol bildete sich zuerst ein feinflockiger weisser Niederschlag, der sich sehr bald in eine zähe klebrige Masse verwandelte. Diese Masse wurde in heissem Wasser gelöst und wieder mit Alkohol gefällt; dabei erschien kein Niederschlag und die ganze Flüssigkeit wandelte sich in eine weisse milchartige Emulsion um. Unter dem Mikroskop betrachtet, bestand diese Emulsion aus kleinsten Oeltröpfchen. Nach mehrtägigem Stehen der Emulsion sammelte sich auf dem Boden des Gefässes eine zähe öltartige Masse, doch war die Flüssigkeit noch ziemlich trübe. Durch Zusatz von wenig Kochsalz wurde die Emulsion in einen Niederschlag von mehr oder weniger flockiger Beschaffenheit verwandelt. Die Niederschläge und die Lösungen des Protaminsulfats von *Accipenser stellatus* enthielten keine merkliche Menge Farbstoff, was bei Darstellung der anderen Protaminsulfate gewöhnlich der Fall ist. Das Protaminsulfat wurde in das Pikrat und daraus wieder in das Sulfat übergeführt. Darauf wurde das Protaminsulfat noch dreimal aus der wässerigen Lösung mit Alkohol gefällt, bis ein schneeweisser ganz flockiger Niederschlag erhalten war. Aus der ca. 21,0 g schweren, lufttrockenen, mit heissem Alkohol und Aether extrahirten Spermatozoenmasse des *Accipenser stellatus* habe ich über 3,2 g Protaminsulfat gewonnen. Das Protaminsulfat besitzt alle für echte Protamine typischen Eigenschaften: es gibt eine schöne Biuretreaction, dagegen keine Millon'sche Reaction, in einer schwach ammoniakalischen Lösung fällt das Protaminsulfat die Wittepeptonlösung. Die Löslichkeit des Protaminsulfats in Wasser ist, wie es scheint, viel grösser, als diejenige des Scombrin- oder Clupeinsulfats: nur nach dem Eindampfen der wässerigen Protaminsulfatlösung bis auf einige Cubikcentimeter konnte ich nach dem Erkalten der Flüssigkeit eine kleine Menge des

wässrige Lösung des Protaminsulfats des Accipenser stellatus reagirt auf Lackmuspapier sauer. Die Elementaranalyse des bei 105—115° C. bis zum constanten Gewicht ausgetrockneten Protaminsulfats des Accipenser stellatus gab folgendes Resultat:

1. 0,1464 g Substanz gaben 0,1076 g BaSO<sub>4</sub>
3. 0,2072 „ „ „ 0,1502 „ BaSO<sub>4</sub>
3. 0,1930 „ „ „ 0,2314 „ CO<sub>2</sub> und 0,1038 g H<sub>2</sub>O
4. 0,2016 „ „ „ 0,2438 „ CO<sub>2</sub> „ 0,1188 „ H<sub>2</sub>O
5. 0,1274 „ „ „ 21,1 ccm. N<sub>2</sub> bei 15,5° und 764 mm. Bar.
6. 0,1250 „ „ „ 20,9 „ N<sub>2</sub> „ 19° „ 766 „ „

im Mittel

C	32,69	32,98	32,83
H	5,97	6,54	6,25
N	19,46	19,37	19,41
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	30,91	30,49	30,70

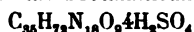
Die gefundenen Analysenzahlen für das Protaminsulfat des Accipenser stellatus stimmen am besten mit der Formel C<sub>35</sub>H<sub>72</sub>N<sub>18</sub>O<sub>9</sub> 4H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> überein.

Berechnet für	Gefunden im Mittel
C <sub>35</sub> H <sub>72</sub> N <sub>18</sub> O <sub>9</sub> 4H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
C—32,81	32,83
H— 6,25	6,25
N—19,68	19,41
O—31,25	31,49
S—10,00	10,02

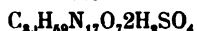
Das Verhältniss C:N ist in den gefundenen Zahlen 1,973.

Wenn man das von mir beschriebene Protamin aus den Spermatozoen des Accipenser stellatus mit den schon bekannten Protaminen, d. h. mit dem Salmin (Clupein), Scombrin und Sturin vergleicht, so sieht man, dass es sich von allen insbesondere von den Protaminen der Salmingruppe sehr scharf unterscheidet. Seiner Herkunft nach muss das neue Protamin dem Sturin nahe stehen, und dies ist in der That der Fall. Das Protaminsulfat des Accipenser stellatus besitzt ebenso wie das Sturinsulfat eine grosse Löslichkeit im Wasser und ist reich an Schwefelsäure. Doch sind die beiden Protamine nicht identisch, was aus den Elementarformeln der beiden Protaminsulfate ganz klar ersichtlich ist:

Die elementare Formel für das Protaminsulfat des Accipenser stellatus



Die elementare Formel für das Salminsulfat



Weitere Untersuchungen über die Spaltungsprodukte (resp. Hexonbasen) des neuen Protamins müssen noch andere Anhaltspunkte für die Beurtheilung, ob das Protamin des Accipenser stellatus in die Sturingruppe gestellt werden soll, ergeben. Vorläufig möchte ich das Protamin aus den Spermatozoen des Accipenser stellatus als « Accipenserin » bezeichnen.

Es bleibt mir zum Schluss übrig, noch einige Worte über das Protaminsulfat des Welses (Silurus glanis) zu sagen. Dieses Protaminsulfat (es sei als « Silurinsulfat » bezeichnet) besitzt einige interessante Eigenschaften. Aus seiner schwefelsauren (1%) Lösung durch Alkohol gefällt, scheidet sich das Silurinsulfat direkt als ein feinflockiger röthlicher Niederschlag aus, der sogar nach langem Stehen nicht wie andere Protaminsulfate in eine klebrige Masse umgewandelt wird. Die Löslichkeit des Silurinsulfats sogar in heissem Wasser ist im Vergleich mit derjenigen der anderen Protaminsulfate sehr gering. Beim Eindampfen der wässerigen Lösung des Silurinsulfats scheidet sich kein Oel aus, sondern es bilden sich bald an den Gefässwänden und auf der Oberfläche der Flüssigkeit sehr feine durchsichtige Häutchen, die beim Umrühren der Flüssigkeit auf den Boden des Gefässes sinken.

Leider konnte ich eine für die Elementaranalyse ausreichende Quantität des Silurinsulfats nicht darstellen und verlor es ausserdem, als ich es durch Thierkohle von einem röthlichen Farbstoffe befreien wollte. Die Thierkohle war zu fein gepulvert und ging mit der Protaminsulfatlösung durch die Filter durch. Ich möchte mir die weitere Untersuchung der Protamine des Accipenser stellatus und des Welses vorbehalten.

---

1) A. Kossel. Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 174, 1898.

# **Chemische und physiologische Studien über die Guanylsäure.**

Von  
**Ivar Bang.**

---

## **II. Theil. Physiologische Studien.**

Mit vier Abbildungen.

(Der Redaction zugegangen am 19. Januar 1901.)

---

Während man die chemischen Untersuchungen über die Nucleosäuren sehr fleissig getrieben hat, liegen physiologische Untersuchungen über diesen Gegenstand beinahe garnicht vor. Nur ganz vereinzelte Untersuchungen sind hierüber veröffentlicht.

Minkowski<sup>1)</sup> beobachtete nach Fütterung mit Salmonucleinsäure bei Hunden eine reichliche Ausscheidung von Allantoin und bei Menschen eine entsprechende Vermehrung der Harnsäure.

Niemann<sup>2)</sup> hat nach Injection der Thymusnucleinsäure eine Hyperleucocythose gesehen.

Bei Alex. Schmidt<sup>3)</sup> ist zu lesen, dass Injection von Nucleoproteiden einen grossen Einfluss auf die Coagulation des Blutes ausübt. Lilienfeld<sup>4)</sup> findet nach Injection seines Nucleohistons ebenfalls grosse Veränderungen der Coagulationszeit des Blutes. Die Experimente Lilienfeld's sind aber wenig beweisend, da das Nucleohiston nicht ein einheitlicher Körper ist.

---

1) Archiv f. exper. Pathol. u. Pharm. Bd. 41.

2) Archiv f. Anatomie u. Physiologie, Physiol. Abth., 1899.

3) Blutlehre.

4) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XX.

Nucleoproteid.

Im Anschluss an meine chemischen Untersuchungen über die Guanylsäure habe ich nun auch die physiologischen Wirkungen der Guanylsäure nach Injection in die Blutbahn studirt.

In dem ersten Versuch war die Aufmerksamkeit besonders auf eine Einwirkung auf die Coagulationszeit gerichtet.

Versuch Nr. 1. Bei einem Hunde ( $\frac{3}{4}$ , 8 Monate alt) wurden art. und vena femoralis dextra freigelegt und Kanülen in beide Gefässe eingeführt, in die Vene zur Injection der Guanylsäure, in die Arterie zur Entnahme von Blutproben.

1<sup>h</sup> 40<sup>m</sup> p. m. wurde eine Vorprobe zur Bestimmung der normalen Coagulationszeit entnommen. Diese Probe coagulirte 1<sup>h</sup> 44<sup>m</sup>, also nach 4 Minuten.

1<sup>h</sup> 49<sup>m</sup> wurde 0,29 g Guanylsäure (Präparat Nr. IV), in 28 ccm. 0,7%iger Kochsalzlösung gelöst, injicirt.

1<sup>h</sup> 52<sup>1/2</sup><sup>m</sup> entnahm ich die erste Blutprobe, welche 2<sup>h</sup> 2<sup>1/2</sup><sup>m</sup> coagulirte, also nach 10 Minuten. Die zweite Probe wurde um 1<sup>h</sup> 55<sup>3/4</sup><sup>m</sup> entnommen und coagulirte unvollständig in 16 Minuten, vollständig erst nach 20 Minuten. Die dritte Probe um 2<sup>h</sup> 5<sup>m</sup> coagulirte nach 9 Minuten. Die folgenden Proben coagulirten momentan.

Aus diesem Versuch geht hervor, dass die Injection einer sehr geringen Menge Guanylsäure eine deutliche anticoagulirende Wirkung auf die Coagulationsfähigkeit des Blutes ausübt. Diese Wirkung ist aber nur vorübergehend. Als Nachwirkung sieht man eine entgegengesetzte Wirkung: Verminderung der Coagulationszeit.

Während des Versuches beobachtete ich weiter folgende Erscheinungen:

Unmittelbar nach der Einspritzung wurde der Hund sehr unruhig. Die Respiration war unregelmässig und schnell. Dies Stadium dauerte aber nur ganz kurze Zeit und nach einigen Minuten lag der Hund wie in einer Narcose ganz ruhig da und reagirte kaum auf einen äusseren Eindruck. Die Respiration ist langsam und oberflächlich; Thorax und Abdomen arbeiten nicht mit einander synchron, indem die Abdominalexpiration

schneller als die thorakale Expiration verläuft. Andererseits ist die abdominale Inspiration verlängert. Am Ende des Versuchs (nach einer halben Stunde) treten wieder normale Verhältnisse ein. Weiter konnte man einen Einfluss auf den Blutdruck constatiren, indem das Blut bei der Entnahme der 2., 3. und 4. Blutprobe sehr langsam aus der Kanüle floss, während es vor und nachher in vollem Strahle ausspritzte. Die Guanylsäure übt somit eine toxische Wirkung auf Respiration und Blutdruck aus.

Während der Harn vor dem Versuch ganz normal war, entleerte der Hund nach dem Versuch einen Harn, welcher alkalisch reagierte, Eiweiss enthielt und reducirte. Polarithmetrisch bestimmt, enthielt er 0,78% Zucker, titrimetrisch (Fehling) 0,83%. Der Zucker vergor vollständig und es konnten schöne Osazonkrystalle dargestellt werden. Der Harnzucker war also Traubenzucker. Dagegen konnte eine Pentose nicht nachgewiesen werden. Ebenso wenig konnte die Guanylsäure in diesem Falle im Harn nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden war die Glycosäure verschwunden, dagegen dauerte sowohl die Albuminurie wie die alkalische Reaction des Harns 48 Stunden.

Diese Ergebnisse forderten dringend zu einem genaueren Studium der verschiedenen Phänomene auf.

In den folgenden Versuchen wurde deshalb sowohl die Respiration als der Blutdruck graphisch registriert. Ebenso wurde die Coagulationsfähigkeit des Blutes und der Harn genau untersucht.

Die Respiration (thorakale und abdominale) wurde durch einen etwas modificirten Donders'schen Pneumographen, mit Marey'schen tambours à liviers verbunden, registriert. Auf den Tracées entsprechen die aufsteigenden Theile der Curve den Inspirationen, die Senkungen dagegen den Expirationen.

Der Blutdruck wurde durch eine Combination des Quecksilbermanometers mit einem Pistonrecorder registriert. Die Druckcurve des Manometers wird somit in eine Volumcurve übergeführt. Das Manometer war vollständig kalibriert und der Pistonrecorder genau verarbeitet. Durch Vorversuche

und den geschilderten Grundsätzen des Pistomrecorders festgestellt. Bei dieser Versuchsanordnung kann man immer den Blutdruck durch das Manometer kontrolliren. Weiter ist der unangenehme Ludwig'sche Hebel überflüssig und zum dritten kann man hier die Ausschläge des Recorders beherrschen und ändern und somit der Curve eine passende Dimension geben. Dieser Apparat functionirt sehr gut und registriert sehr genau.

Die Curven wurden auf einem Kymographion, das durch einen Dynamo getrieben wurde, aufgeschrieben. Das Papier war über 3 Meter lang und genügte bei einer Rotation von 2 mm. per Secunde zu einem Versuch von einer halben Stunde. Die Zeile ist immer in Secunden markirt.

Bei den folgenden Versuchen wurden zwei Arterien und eine Vene (gewöhnlich beide Carotiden und eine vena jugularis externa, aber in anderen Versuchen art. und vena femoralis) frei präparirt. Die eine Arterie war mit dem Manometer zur Blutdruckbestimmung verbunden, die andere Arterie benutzte ich zur Entnahme von Blutproben. Das Blut wurde direkt aus der Arterie ohne Anwendung einer Kanüle in Uhrgläser gelassen. In die Vene wurde die Guanylsäurelösung mit einer Spritze injicirt. Die Guanylsäure war immer in 0,7%igem Kochsalz gelöst. Die Lösungen waren auf eine Temperatur von 37—38° erwärmt.

Ich habe, von dem ersten Versuch abgesehen, 3 Versuche mit Injection der Guanylsäure an Hunden ausgeführt und werde die Resultate referiren:

1. In allen Versuchen konnte man unmittelbar nach der Injection einen mehr oder weniger ausgebildeten Excitationszustand beobachten, der bald in eine Narkose überging. Die Narkose war aber niemals eine vollständige, sie war nur vorübergehend und dauerte einige Minuten.

2. Eine andere charakteristische Wirkung der Guanylsäureinjection ist die Einwirkung auf die Coagulationszeit, indem die Guanylsäure nach der Injection ins Blut eine deutliche anticoagulirende Wirkung ausübt. Folgende Tabelle zeigt die Coagulationsverhältnisse bei den einzelnen Versuchen:

Versuch Nr.	Injicirte Guanylsäure Menge per Kilo Hund	Normale Coagulationszeit		Maximale Wirkung der Guanylsäure.	
		m.	s.	m.	s.
1	0,058	3	50	20	—
2	0,018	10	—	19	—
3	0,040	6	—	2h	—
4	0,036	Nicht beobachtet		40	—

Man sieht aus der Tabelle, dass eine Injection von 0,04 g Guanylsäure per Kilo Hund eine nicht unbedeutende Verzögerung der Gerinnung ausübt, während diese Wirkung nach einer Injection von 0,02 g per Kilo weniger ausgebildet ist. Aber auch in diesem Falle ist eine deutliche Verzögerung zu constatiren.

Eine ähnliche Verzögerung der Gerinnung wurde hervorgerufen, wenn man etwas Blut in ein Reagensglas, das etwas Guanylsäurelösung enthielt, hineinbrachte. Zwei Blutproben, jede à 5 ccm., wurden einem Hunde entnommen. Zu der einen Probe setzte ich 1 ccm. 0,7%ige Kochsalzlösung, zu der anderen 1 ccm. einer Guanylsäurelösung in 0,4%igem Kochsalz. Die Menge der Guanylsäure in 1 ccm. war 0,02 g. Nach einer Stunde war die letzte Probe noch nicht geronnen, während die Kontrollprobe in 9 Minuten coagulirte. In allen Versuchen, sowohl nach dem Einspritzen der Guanylsäure ins Blut, als auch bei dem Reagensversuch, beobachtete ich eine ähnliche Erscheinung, wie Thompson<sup>1)</sup> bei seinen Reagensversuchen mit Blut und Protamin fand: das Blut bekam ein körniges Aussehen. Diese Körnchen erwiesen sich als zusammengesetzt aus Klümpchen rother Blutkörperchen. Bald trat eine schnelle Senkung der Körperchen ein und eine schöne, klare Schicht von Blutplasma erschien über dem Bodensatz.

Es ist nicht ohne Interesse, zu notiren, dass das Protamin in seiner Wirkung auf Gerinnung der Guanylsäure sehr nahe steht. Thompson<sup>1)</sup> fand, dass eine Injection von 0,01—0,03 g

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX.



Sowohl die Guanylsäure als das Protamin üben somit eine anticoagulirende Wirkung in viel kleineren Dosen als die Albumosen aus.

3. Athmung. Wie man aus dem ersten Versuche erwarten konnte, übt die Guanylsäure eine ausgesprochene und merkwürdige Wirkung auf die Respiration aus. Dies ist aus Figur 1 ersichtlich.

Man findet während und unmittelbar nach der Injection eine forcirte Respiration. Dies Stadium entspricht genau der Excitationsperiode, welche vorher besprochen worden ist. Wenn es vorübergegangen ist, sieht man einen charakteristischen Respirationstypus; die Respiration zeichnet sich dadurch aus, dass die Brustathmung oberflächlich und langsam wird, während die diaphragmatische Athmung nicht besonders schwächer als vorher ist. Weiter sieht man, dass die abdomniale Respiration zwei inspiratorische Gipfel besitzt, wovon der erste, kleinere der Inspiration des Thorax entspricht, während der andere und grössere mit der Expiration des Thorax übereinstimmt. Nach dieser zweiten Inspiration kommt dann im Gegensatz zu der langsamen Expiration des Thorax eine kurze, kräftige Expiration des Abdomens. Die ganze Respiration macht den Eindruck, als ob sich ein Widerstand im Luftrohr befindet, den der Thorax sich vergebens bemüht, zu überwinden. Die starke Respiration des Abdomens führt es dann aus. Dieser Respirationstypus dauert während des ganzen Versuchs.

In einem folgenden Versuch kommt aber dieser Respirations-typus, welcher in drei Versuchen beobachtet ist, nicht besonders zum Vorschein, wie die Figur illustriert.

4. Blutdruck. Ebenso wie die Protamine eine Blutdruckerniedrigung hervorrufen, so ist auch nach der Injection von Guanylsäure eine schnelle und bedeutende Blutdruckerniedrigung bemerkbar, wie man aus den Tracéen ersehen kann. In den zwei Versuchen, deren Tracéen auf S. 208 und S. 209 wiedergegeben sind, haben wir eine Erniedrigung von 180 mm. Hg bis 70 mm. Hg und von 200 mm. Hg bis 130 mm. Hg, also nicht

weniger als 110 mm. Hg resp. 70 mm. Hg (Versuch Nr. 3 (Fig. 1) und 4 (Fig. 2). In Versuch Nr. 2 war die Erniedrigung nur 20 mm. Hg (160—140 mm. Hg). In diesem Falle trat eine partielle Coagulation in der Kanüle ein. Die Blutdruckerniedrigung tritt schon während der Injection ein. (In Fig. Nr. 2 wurde die Guanylsäurelösung in 3 Portionen eingespritzt; man sieht danach 3 Erniedrigungen; die letzte ist dauerhaft.) Weiter dauert die Erniedrigung einige Minuten. Dann steigt der Blutdruck langsam und ist nach etwa  $\frac{1}{2}$  Stunde wieder normal. Besonders die Pulsbewegungen werden während der Erniedrigung sehr klein und wachsen wieder, wenn der Blutdruck steigt. Zuletzt werden auch sie normal.

Aus meinen Versuchen geht nicht mit Bestimmtheit hervor, auf welche Weise die Guanylsäureinjection die Blutdruckerniedrigung hervorruft. Man kann ebenso gut an eine Arteriendilatation als an eine Parese des Herzens denken.

Das Schicksal der Guanylsäure nach der Einspritzung ist völlig unbekannt. Sie wird nicht oder jedenfalls nur in geringer Menge mit dem Harn ausgeschieden. Nur in einem Falle (Versuch Nr. 5) konnte ich die Guanylsäure im Harn nachweisen und zwar nur in geringer Menge. Einige Spaltungsprodukte der Guanylsäure, wie Pentosen, kommen nicht in den Harnen vor.

Die übrigen Folgen der Guanylsäureinjection sind im Harn zu sehen.

5. Die alkalische Reaction. Während der Harn unmittelbar vor dem Versuch sauer reagiert, kann man schon ca. 1 Stunde nach der Injection in ihm eine ausgesprochene alkalische Reaction finden. Nach 24—48 Stunden reagiert der Harn wieder sauer. Die alkalische Reaction ist in den meisten Fällen ausgeprägt, in einem Falle war jedoch die Reaction ziemlich neutral, niemals habe ich aber eine saure Reaction gefunden. Die alkalische Reaction stimmt nicht mit einer vermehrten Ammoniakausscheidung überein, denn die Harnen enthalten nicht mehr Ammoniak als die normalen Harnen. Das Auftreten der alkalischen Reaction ist ganz unverständlich, da die injicirten Guanylsäurelösungen deutlich sauer reagierten.

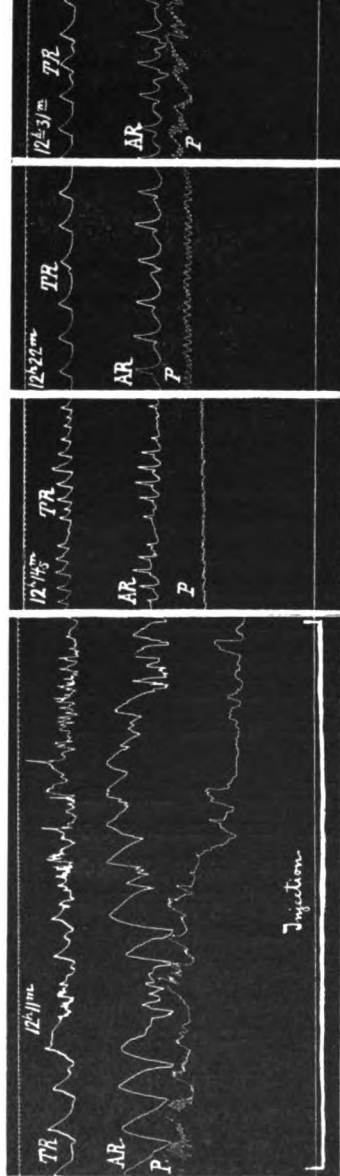
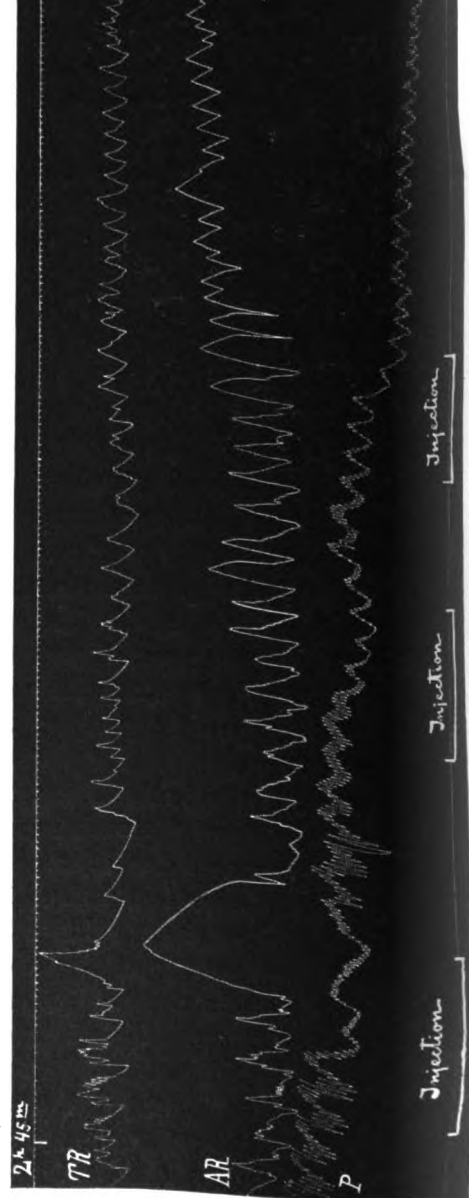


Fig. 1.



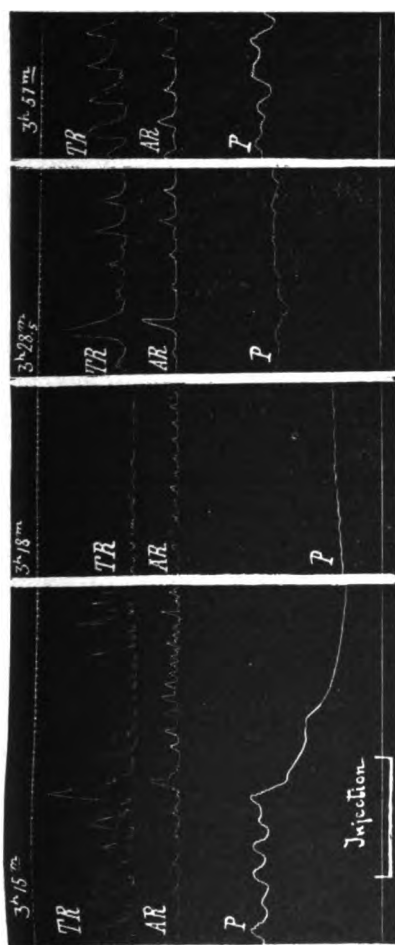


Fig. 3.

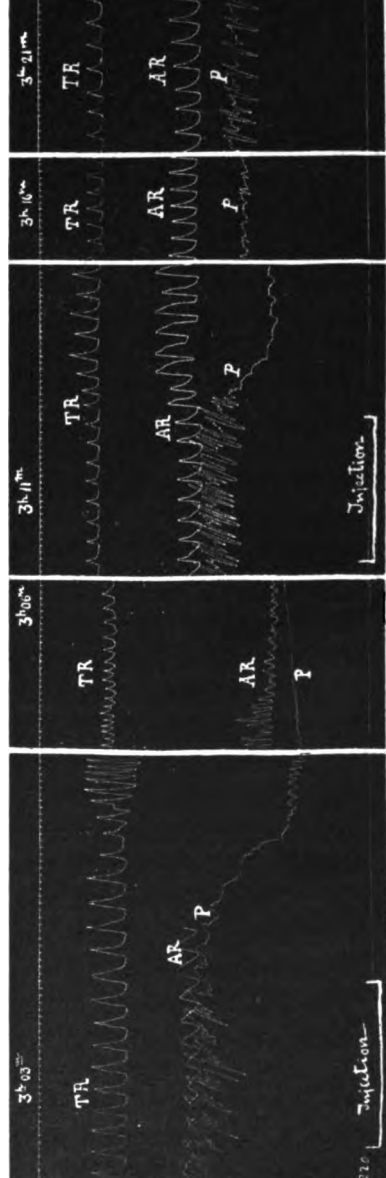


Fig. 4.

war in allen Fällen von einer echten Albuminurie begleitet, welche nur vorübergehend war. Das Eiweiss war immer ein genuiner Eiweisskörper und nicht Albumosen. Die Menge des Eiweisses war ungefähr 1—3 ‰.

Die Ausscheidung des Eiweisses kommt entweder von der Blutdruckerniedrigung her, oder es übt die Guanylsäure eine toxische Wirkung auf die Nieren aus.

7. Die Glycosurie ist nur einmal beobachtet.<sup>1)</sup> Die Ursache der Glycosurie in diesem Falle ist ganz unbekannt. In zwei anderen Fällen habe ich die Hunde vor dem Versuche reichlich gefüttert, um den Glycogenvorrath zu erhöhen, ohne jedoch Glycosurie zu sehen.

---

Ich habe hiermit die Resultate meiner Untersuchungen über die Guanylsäure referirt. Ebenso wie diese Nucleinsäure in chemischer Beziehung interessant und eigenthümlich ist, so ist dies auch mit ihr der Fall, wenn wir die physiologischen Thatsachen überblicken. Keiner anderen, bis jetzt beschriebenen Nucleinsäure hat man solche physiologischen Wirkungen zuschreiben können.

Es wäre nicht ohne Interesse, die physiologischen Wirkungen der Guanylsäure mit denen des Nucleoproteids zu vergleichen.

Da indessen solche Untersuchungen nicht vorliegen, habe ich es unternommen, einige physiologische Untersuchungen mit dem  $\beta$ -Nucleoprotein anzustellen.

Das  $\beta$ -Nucleoprotein verdanke ich theils Prof. Hammarsten, theils habe ich es selbst nach Hammarsten's Methode dargestellt.

Die Versuchsanordnung war ganz dieselbe wie bei den Guanylsäureversuchen.

Ich habe 5 Thierversuche ausgeführt. Die Versuchsthiere waren Hunde. Es wurden untersucht: Athmung, Blutdruck, Coagulationsfähigkeit und Harn.

---

1) Die Guanylsäure wurde im Ganzen 5 Hunden injicirt.

1. Das Nucleoprotein bewirkt, wenn es in einer ähnlichen Menge wie bei den Guanylsäureversuchen eingespritzt wird, ganz dieselben Erscheinungen der Excitation und eines folgenden narkosenähnlichen Zustandes.

2. Wie die Guanylsäure übt auch das Nucleoprotein eine Verzögerung der Coagulation aus. Diese Wirkung ist beim Nucleoprotein mehr hervortretend als bei der Guanylsäure.

Versuchs-Nr.	Injicirte Menge Nucleoprotein pro kg Hund	Normale Coagulationszeit	Maximale Wirkung
		m. s.	m. s.
6	0,05 g	8 —	Nach 24 St. nicht coagulirt.
7	0,053 „	4 —	1 h 43 m.
8	0,049 „	8 —	Nach 5 St. theilweise coagulirt.
9	0,050 „	11 —	Nach 24 St. nicht coagulirt.

Die Injection einer Proteidmenge von 0,05 g per Kilo Hund hebt die Coagulationsfähigkeit des Blutes vollständig oder beinahe vollständig auf. Dies bestätigt die Mittheilungen Alex. Schmidt's über die anticoagulirende Wirkung der Nucleoproteide.

Bekanntlich sind die Albumosen bei Injection ins Blut von Kaninchen unwirksam. Die Gerinnung des Kaninchenblutes wird dadurch nicht gestört. Das Nucleoprotein dagegen übt auch seine Gerinnungshemmung auf das Kaninchenblut aus, wie folgender Versuch zeigt: Einem Kaninchen, 1800 g schwer, wurde 0,25 g Protein, 0,14 g pro Kilo, eingespritzt. Die normale Coagulationszeit war 13 Minuten. Nach der Injection coagulirte das Blut in 26<sup>1</sup>/<sub>2</sub> und 23<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Minuten.

Eine Wirkung lässt sich also auch hier nachweisen, obwohl weniger ausgeprägt als beim Hundeblood.

3. Das Protein übt eine Wirkung auf die Athmung aus: Unmittelbar nach der Einspritzung wird die Athmung schneller und tiefer, später aber sehr oberflächlich. Nur ausnahmsweise lässt sich eine Athmung wie bei den Guanylsäureversuchen nachweisen. Uebrigens verweise ich auf Figur 3.

4. Ebenso wie die Guanylsäure bewirkt eine Einspritzung

druckes. Der Blutdruck sinkt von 180 mm. Hg bis 40 mm. Hg, also nicht weniger als 120 mm. Hg, und von 180 mm. Hg bis 120 mm. Hg, 60 mm. Hg, von 220 mm. Hg bis 80 mm. Hg, 140 mm. Hg. Eine folgende Injection von Proteid, nachdem der Blutdruck wieder normal geworden war, bewirkte eine neue Erniedrigung des Blutdruckes von 220 mm. Hg bis 120 mm. Hg. (Siehe Figur 4.)

Die Blutdruckerniedrigung ist auch nach der Einspritzung von Proteid nur vorübergehend und hört nach einigen Minuten langsam wieder auf. Die Pulsbewegungen sind während der Erniedrigung sehr klein. Sie wachsen mit dem Blutdruck.

5. Im Harne findet man im Gegensatz zu den Guanyl-säureversuchen keine alkalische Reaction. Ebenso ist die Ausscheidung von Eiweiss sehr unbedeutend. Dagegen findet man im Harne regelmässig eine grössere oder geringere Menge Proteid.

Weiter habe ich im Harne auch Zucker gefunden. Von den 5 Versuchen habe ich 3 Mal eine Ausscheidung von Traubenzucker gefunden (nicht Pentose). Der Zuckergehalt war 1,5%, 1,6% und 0,4%. (Uebereinstimmende polarimetrische und titrimetrische Bestimmungen.) In einem Falle (Nr. 4) enthielt der Harn zwar reichlich Zucker, der Versuch war aber wenig beweisend, da der Harn mit ausgebrochenen Brotresten verunreinigt war. Man musste deshalb eine Inversion der Stärke des Brotes befürchten. Endlich war der Harn in einem Falle zuckerfrei.

Wenn ich aber bemerke, dass der Hund in dem letzten Falle eine längere Zeit auf Inanition gehalten war, wird der Widerspruch vielleicht auf folgende Weise gelöst: Nach Injection von Nucleoproteid bekommen die Hunde Glycosurie, wenn sie einen reichlichen Glycogenvorrath haben, nicht aber wenn sie arm an Leberglycogen sind. Ich kann hinzufügen, dass alle übrigen Hunde vorher reichlich gefüttert worden waren.

Selbstverständlich meine ich, nicht durch meine wenigen Versuche die Frage der Glycosurie gelöst zu haben. Ich

sehe aber meine Erklärung für das Auftreten des Zuckers im Harne als die vorläufig am meisten plausible an.

Jedenfalls sehe ich meine Erklärung als eine brauchbare Arbeitshypothese für eventuelle Untersucher an.

Ich glaube dazu berechtigt zu sein, die Glycosurie als ein Sympton nach Injection des Nucleoproteids aufzustellen.

Die Harne enthielten keine  $\beta$ -Oxybuttersäure und nicht Aceton.

Vergleichen wir die Versuchsergebnisse nach der Injection von Guanylsäure und Nucleoproteid, so stimmen diese in vielen Beziehungen sehr gut mit einander überein. In beiden Fällen finden wir Excitation und Narkose der Thiere, ähnliche Athmung und Blutdruckerniedrigung. Nur im Harne begegnen wir deutlichen Verschiedenheiten, bei den Guanylsäureversuchen alkalische Reaction und Albuminurie, bei dem Proteid vorzugsweise Proteidurie und Glycosurie.

Es wäre in dieser Hinsicht nicht ohne Interesse, den Eiweisscomponenten des Proteids in physiologischer Beziehung zu erforschen. Versuche hierüber fehlen. Auch kennen wir nicht seine chemischen Eigenschaften und Zusammensetzung. Ich habe mich aber davon überzeugt, dass der Eiweisscomponent in chemischer Beziehung sehr eigenartig ist. Er kann z. B. nicht gut in eine bestimmte Eiweissgruppe einrangirt werden.

Ich benutze die Gelegenheit, Herrn Prof. Torup, welcher mich bei der Ausführung der Thierversuche und sonst in vielfacher Weise unterstützt hat, meinen verbindlichsten Dank auszusprechen.



# Beiträge zur Kenntniss der Milchsäurebildung im thierischen Organismus beim Sauerstoffmangel.

Von

S. Salto und R. Katsuyama.

---

(Aus dem medicinisch-chemischen Institut der Kaiserl. Universität Kyoto.)

(Der Redaction zugegangen am 23. Januar 1901.)

---

Es kann als sicher festgestellt angesehen werden, dass nach gänzlicher Exstirpation der Leber die Gänse Milchsäure im Harne ausscheiden.<sup>1)</sup> Es unterliegt auch keinem Zweifel, dass bei entleberten Gänsen die Ausfuhr der Harnsäure bis auf unbedeutende Mengen sinkt, während der Harnstickstoff grossenteils in Form von Ammoniak erscheint. Im Anschluss an diese Thatsachen exstirpirte Nebelthau<sup>2)</sup> die Leber von 265 Fröschen, sammelte während 4 Tagen ihren Harn und erhielt aus 7,8 Liter Harn 0,127 g Zinksalz, welches grosse Aehnlichkeit mit milchsaurem Zink hatte. Aus Versuchen von Zillessen<sup>3)</sup> ergab sich, dass nach Unterbindung der Leberarterie bei Hunden und Kaninchen regelmässig Milchsäure im Harne auftrat. Sehr bemerkenswerth ist die Beobachtung von Minkowski,<sup>4)</sup> dass die Ausscheidung der Milchsäure im Harne ganz ausbleibt, wenn man den Enten die Leber partiell exstirpirt. Unlängst ist es Salaskin und Zaleski<sup>5)</sup> gelungen, Hunde nach der totalen Entfernung der Leber bis zu 13 Stunden

---

1) Minkowski, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 21, S. 41.

2) Nebelthau, Zeitschr. f. Biol., Bd. 25, S. 122.

3) Zillessen, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 389.

4) Minkowski, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmakol., Bd. 31, S. 214.

5) Salaskin und Zaleski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, S. 517.

am Leben zu erhalten und die Veränderungen, welche der Stoffwechsel nach dieser Operation erleidet, genau zu verfolgen. Von den Schlussfolgerungen, die die genannten Autoren aus ihren Versuchen gezogen haben, wollen wir nur die folgenden hervorheben: «Unsere Hunde mit der exstirpierten Leber erinnern in vielen Beziehungen an die Gänse von Minkowski. Von allen Erscheinungen, die hier und dort beobachtet worden sind, muss an erster Stelle hervorgehoben werden: bei den Gänsen von Minkowski das Auftreten von Milchsäure im Harn, bei unseren Hunden die saure Reaction des Harns, welche sogar durch Einführung grosser Gaben Soda nicht abgeändert werden konnte; in einem Fall konnten wir sogar unzweifelhaft im Harn des Hundes die Anwesenheit von Milchsäure nachweisen.» Zieht man nun die erwähnten Beobachtungen in Erwägung, so liegt die Vermuthung nahe, dass die Milchsäureproduktion mit der Störung der Leberthätigkeit in einem gewissen Zusammenhange steht, um so mehr, als bei der acuten gelben Leberatrophie Schultzen und Riess<sup>1)</sup> bereits das Auftreten grosser Milchsäuremengen im Harne nachgewiesen haben.

In einer grösseren Anzahl von Versuchsreihen hat Araki<sup>2)</sup> mit Bestimmtheit erwiesen, dass beim Sauerstoffmangel — gleichgültig, durch welches Mittel er hervorgerufen wird — die Milchsäure in reichlicher Menge im Harne von Kaninchen zum Vorschein kommt. Dieser Befund ist auch für den mit CO vergifteten Menschen durch Münzer und Palma<sup>3)</sup> bestätigt worden.

In der Litteratur finden wir aber keine sichere Angabe darüber, dass der Sauerstoffmangel die Bildung von Milchsäure bei Hühnern verursacht. Es liegen zwar einige Versuche von Araki<sup>4)</sup> vor, die am Huhn mit Weizenfütterung und an dem-

---

1) Schultzen und Riess, citirt nach Araki, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, S. 331.

2) Araki, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XIX, S. 422.

3) Münzer und Palma, Separatabdruck aus d. Zeitschr. f. Heilkunde, Bd. 15, S. 1.

4) Araki, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 356.

Hauptergebnisse aus diesen Versuchen sind die folgenden: «Durch Einwirkung von Sauerstoffmangel auf gut ernährte Thiere treten Zucker und Milchsäure im Harne auf; bei Thieren, welche sich im Hungerzustande befinden, wird durch den Sauerstoffmangel wohl Uebergang von etwas Milchsäure bewirkt, aber Zucker findet sich nicht darin.» Allein diesen Versuchsergebnissen gegenüber lässt sich ein Einwand geltend machen, dass es keineswegs bewiesen ist, dass die Hühner wirklich die Milchsäure im Harne ausgeschieden haben; denn Araki hat nicht einmal das aus dem Harne von Hühnern dargestellte Zinksalz analysirt. Ausserdem hat Araki versäumt, das Blut von den zu seinen Versuchen benutzten Hühnern auf Milchsäure zu untersuchen.

Wenn überhaupt die Milchsäure in Folge des O-Mangels in reichlicher Menge im Organismus von Hühnern entsteht, so muss dieselbe zuerst in das Blut in reichlicher Menge übergehen; die übergrosse Menge der Milchsäure im Blut ist dann die Ursache für ihr Auftreten im Harne. Wir haben uns dabei die Aufgabe gestellt, eingehende Untersuchungen über die folgenden Fragen anzustellen:

1. Ob das Blut von gesunden und gut ernährten Hühnern regelmässig Milchsäure enthält?
2. Ob der Sauerstoffmangel die Mehrproduktion der Milchsäure bei Hühnern bewirkt?
3. Ist die Säure, die Araki aus dem Harn von erstickten Hühnern dargestellt hat, mit Milchsäure identisch?

Als Versuchsobject bedienten wir uns ausschliesslich Hühner, die gut mit Reis gefüttert wurden.

#### **I. Das Vorkommen der Milchsäure im normalen Hühnerblut.**

Ueber das Vorkommen der Milchsäure im normalen Hundeblut hat Gaglio<sup>1)</sup> eingehende Untersuchungen angestellt. Danach sollte das Blut von Hunden bei Fleischfütterung 0,39 pro Mille Milchsäure als constanten Bestandtheil enthalten. Es

---

1) Gaglio, Archiv f. Physiologie u. Anatomie, 1886, S. 400.

ist auch Berlinerblau<sup>1)</sup> gelungen, Fleischmilchsäure im normalen Kaninchen- und Hundeblood mit absoluter Sicherheit nachzuweisen; er hat sogar 200 ccm. direkt in Alkohol aufgefangenen venösen Menschenblutes analysirt und darin 0,1562 g Milchsäure gefunden. Diese Befunde sind bald von mehreren Forschern bestätigt worden.

Dass das normale Hühnerblood auch regelmässig Milchsäure enthält wie das Säugethierblood, dafür werden die nachstehenden Versuche einen sicheren Beweis liefern.

Die Methode, die wir bei Analysen des Bloods benutzt haben, ist folgende: Das aus den freigelegten Halsgefässen und dem Herzen des Thieres aufgefangene und gewogene Blood wurde mit dem 6fachen Volumen 96%igen Alkohols in einem Gefässe versetzt und nach 12stündigem Stehenlassen unter zeitweisem Umrühren abfiltrirt. Der Rückstand wurde noch 4—5 mal mit 96%igem Alkohol ausgezogen und ausgepresst. Von den Alkoholauszügen wurde der Alkohol abdestillirt, der Rückstand in ein wenig Wasser aufgenommen, mit einigen Tropfen Sodalösung schwach alkalisch gemacht und zur Entfernung der Fette 5 mal mit erneuerten Mengen Aether geschüttelt. Die entfettete Flüssigkeit wurde mit dem gleichen Volumen mässig verdünnter Phosphorsäure angesäuert und 6 mal mit dem 5fachen Volumen Aether geschüttelt. Der nach dem Abdestilliren des Aethers zurückbleibende Syrup wurde mit Barytwasser neutralisirt, filtrirt und ausgewaschen; die gesammten Filtrate wurden nach dem Ausfällen des Baryts mit verdünnter Schwefelsäure auf dem Wasserbade concentrirt und mit Aether erschöpft. Von den klar abgegossenen Aetherextracten wurde der Aether abdestillirt, der Rückstand mit Wasser und überschüssigem Zinkoxyd gekocht, heiss filtrirt und gut ausgewaschen. Die filtrirte Lösung wurde in einem gewogenen Schälchen auf ein kleines Volumen auf dem Wasserbade verdunstet und unter Zusatz von einigen Tropfen Alkohol zur Krystallisation stehen gelassen.

---

<sup>1)</sup> Berlinerblau, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. 23, S. 333.

Im normalen Hühnerblute von 5 Thieren, zusammen in 430 g, wurden gefunden: 0,1851 g Zinksalz.

## 2. Versuch.

Aus 428 g Blutes von 5 Hühnern wurden erhalten: 0,1439 g Zinksalz.

## 3. Versuch.

Aus 345 g Blutes von 5 Hühnern wurden dargestellt: 0,1145 g Zinksalz.

Zur Analyse wurden die gewonnenen Zinksalzportionen vereinigt und durch Umkrystallisation gereinigt. Das so gereinigte Zinksalz zeigt die charakteristischen Formen des Zinklactates.

0,1895 g lufttrockenen Salzes verloren bei  $110^{\circ}$  C. 0,0244 g an Gewicht entsprechend 12,87%  $H_2O$ .

0,1651 g wasserfreien Salzes in siedendem Wasser gelöst, mit Natriumcarbonat gefällt, gaben nach dem Glühen des Zinkcarbonats 0,0471 g  $ZnO = 26,61\%$  Zn.

0,1427 g lufttrockenen Salzes verloren bei  $110^{\circ}$  C. 0,0187 g  $H_2O = 13,10\%$   $H_2O$ .

0,1240 g wasserfreien Salzes lieferten 0,0410 g  $ZnO = 26,50\%$  Zn.

Berechnet	Gefunden:		
für $(C_3H_5O_3)_2Zn + 2H_2O$	I.	II.	Mittel
$H_2O$ 12,9%	12,87%	13,10%	12,98%
Zn 26,74%	26,61%	26,50%	26,55%

Es kann also kein Zweifel mehr darüber obwalten, dass das von uns aus dem normalen Hühnerblute dargestellte Zinksalz mit paramilchsaurem Zink identisch ist. Somit ist mit absoluter Sicherheit erwiesen, dass die Paramilchsäure ein constanter Bestandtheil des normalen Hühnerblutes ist.

Der besseren Uebersichtlichkeit halber stellen wir die Resultate der erwähnten Versuche noch einmal zusammen:

Tabelle I.

Gewicht des angewandten Blutes in g	Das gefundene Zinklactat in g	Die Milchsäure in 100 g Blutes %
430	0,1651	0,0284
428	0,1439	0,0280
345	0,1145	0,0245

## II. Einwirkung von Sauerstoffmangel auf die Milchsäurebildung.

Dass sowohl durch Kohlenoxydvergiftung, als durch den Sauerstoffmangel die Eiweisszersetzung in der Zeiteinheit auf das Doppelte der Norm ansteigt, hat bekanntlich Fränkel bei Hunden dargethan. Durch Araki<sup>1)</sup> ist in einer Anzahl sehr eingehender Arbeiten der Nachweis geführt, dass der reine Sauerstoffmangel ganz den gleichen Einfluss auf die Milchsäureproduktion im Kaninchenkörper ausübt wie das Kohlenoxyd. Vor Kurzem hat Kunkel<sup>2)</sup> beobachtet, dass die Kaltblüter auch dann noch keine Störungen im Befinden erkennen lassen, wenn nur 0,156% ihres Hämoglobins an O, der Rest an CO gebunden ist, dann genügt bei Kaltblütern der im Blutplasma absorbierte Sauerstoff den Anforderungen des Körpers an oxydative Leistung noch immer. Er hat daraus geschlossen, dass dem Kohlenoxyd keine andere physiologische Wirkung zukommt, als die Verdrängung des Sauerstoffs aus der Bindung an Hämoglobin.

Man darf es nun als höchst wahrscheinlich bezeichnen, dass alle chemischen Aenderungen der Lebensprocesse, die sich bei der CO-Vergiftung beobachten lassen, lediglich auf den Sauerstoffmangel zurückzuführen sind. Aus diesem Grunde haben wir die Verarmung des Blutes an Sauerstoff stets durch vorsichtige Vergiftung mit CO herbeigeführt.

<sup>1)</sup> Araki, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 335, sowie Bd. XIX, S. 422.

<sup>2)</sup> Kunkel, cit. nach Centralbl. f. Physiol., 1900, S. 565.

einen mit Glasfenstern versehenen Kasten, in welchen Kohlenoxydgas eingeleitet werden konnte, gebracht. Sobald das Thier asphyktisch geworden, wurde es herausgezogen und, nachdem es sich an der frischen Luft erholt hatte, von Neuem der CO-Gasatmosphäre ausgesetzt.

Die Analyse des Blutes haben wir genau nach der oben geschilderten Methode ausgeführt.

Um den Harn möglichst rein zu erhalten, wurde der Mastdarm stets oberhalb der Kloake unterbunden und die dabei angelegte Wunde wieder sorgfältig zugenäht. Da eine geringe Quantität des Harns uns immer zur Verfügung stand, so haben wir denselben zur Darstellung der Milchsäure ohne Weiteres mit dem 10fachen Volumen 96%igen Alkohols gemischt und nach 12stündigem Stehen filtrirt. Nach dem Abdestilliren des Alkohols wurde der Rückstand mit Phosphorsäure stark angesäuert und dann genau so behandelt, wie bei der Analyse des Blutes.

#### 4. Versuch.

10. Mai 1900. Ein kräftiger Hahn wurde 3 Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 54 g Blutes wurden erhalten: 0,0296 g wasserfreies Zinksalz.

#### 5. Versuch.

20. Mai 1900. Ein Hahn von 1918 g Körpergewicht wurde 5 Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 87 g Blutes wurden dargestellt: 0,1269 g Zinksalz.

#### 6. Versuch.

30. Mai 1900. Ein 2137 g schwerer Hahn wurde 5 Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 76 g Blutes wurden erhalten: 0,1278 g Zinksalz.

#### 7. Versuch.

4. Juni 1900. Ein 2687 g schwerer Hahn wurde 5 Stunden lang mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getödtet. Aus 63 g Blutes wurden erhalten: 0,0597 g Zinksalz.

6. Juni 1900. Ein kräftiger Hahn von 2717 g Körpergewicht wurde  $5\frac{1}{2}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getötet. Aus 90 g Blutes wurden erhalten: 0,1663 g Zinksalz.

#### 9. Versuch.

15. Juni 1900. Ein Hahn von 2051 g Körpergewicht wurde von 10 Uhr 30 Min. Vorm. mit CO vergiftet; 2 Uhr Nachm. war das Thier durch Asphyxie zu Grunde gegangen. Aus 50 g Blutes, das aus dem Herzen entzogen wurde, wurden erhalten: 0,0612 g Zinksalz.

#### 10. Versuch.

22. Juni 1900. Ein Hahn von 1507 g Körpergewicht wurde  $6\frac{1}{2}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getötet. Aus 30 g Blutes wurden gewonnen: 0,0550 g Zinksalz.

#### 11. Versuch.

25. Juni 1900. Ein 1445 g schweres Huhn wurde  $7\frac{1}{4}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getötet. In 34 g Blutes wurden gefunden: 0,1113 g Zinksalz.

#### 12. Versuch.

2. Juli 1900. Ein 2656 g schwerer Hahn wurde  $6\frac{2}{3}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 63 g Blutes wurden erhalten: 0,0844 g Zinksalz.

#### 13. Versuch.

4. Juli 1900. Ein 1856 g schweres Huhn wurde  $5\frac{1}{4}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. In 49 g Blutes wurden gefunden: 0,0753 g Zinksalz.

#### 14. Versuch.

9. Juli 1900. Ein Hahn von 2290 g Körpergewicht. Um den Harn vom Koth getrennt aufzufangen, wurde vor der Vergiftung der Mastdarm oberhalb der Einmündungsstelle der Ureteren in die Kloake mit einem dicken Seidenfaden abgebunden. Das so operirte Thier wurde 7 Stunden lang mit



erhalten: 0,0631 g Zinksalz.

Aus 22 ccm. Harn, den das Thier während der Vergiftung geliefert hat, wurden dargestellt: 0,3083 g Zinksalz.

#### 15. Versuch.

29. Juli 1900. Ein Hahn von 2147 g Körpergewicht. Nach der Abbindung des Mastdarms wurde das Thier  $3\frac{1}{4}$  Stunden mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getötet. Aus 67 g Blutes wurden gewonnen: 0,0697 g Zinksalz.

Der Harn, den die Hühner während der CO-Vergiftung entleerten, reagierte stets sauer.

Aus 10 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung geliefert hat, wurden erhalten: 0,0731 g Zinksalz.

#### 16. Versuch.

12. September 1900. Ein sehr gut ernährter Hahn von 2113 g Körpergewicht. Nach der Abbindung des Mastdarms wurde das Thier  $7\frac{1}{2}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 83 g Blutes wurden erhalten: 0,1447 g Zinksalz.

Aus 35 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung entleerte, wurden dargestellt: 0,3521 g Zinksalz.

#### 17. Versuch.

4. October 1900. Ein Hahn von 1778 g Körpergewicht. Nach der Abbindung des Mastdarms wurde das Thier  $4\frac{1}{2}$  Stunden mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getötet. Aus 46 g Blutes wurden dargestellt: 0,0682 g Zinksalz.

Aus 22 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung lieferte, wurden erhalten: 0,1820 g Zinksalz.

#### 18. Versuch.

30. October 1900. Ein Hahn von 2179 g Körpergewicht. Nach der Unterbindung des Mastdarms wurde das Thier  $2\frac{1}{2}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 82 g Blutes wurden erhalten: 0,1346 g Zinksalz.

Aus 11 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung entleerte, wurden erhalten: 0,0611 g Zinksalz.

### 19. Versuch.

13. November 1900. Ein Hahn von 3089 g Körpergewicht. Nach der Unterbindung des Mastdarms wurde das Thier 7 Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 89 g Blutes wurden erhalten: 0,1481 g Zinksalz.

Aus 30 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung geliefert hat, wurden dargestellt: 0,1733 g Zinksalz.

### 20. Versuch.

15. November 1900. Ein kräftiger Hahn von 3481 g Körpergewicht. Nach der Unterbindung des Mastdarms wurde das Thier 4 Stunden lang mit CO vergiftet und dann verblutet. Aus 148 g Blutes wurden erhalten: 0,3245 g Zinksalz.

Aus 32 ccm. Harns, welchen das Thier während der Vergiftung entleerte, wurden dargestellt: 0,2850 g Zinksalz.

### 21. Versuch.

23. November 1900. Ein 2195 g schwerer Hahn wurde nach der Unterbindung des Mastdarms 3 Stunden lang mit CO vergiftet.

Aus 24 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung entleerte, wurden erhalten: 0,1175 g Zinksalz.

### 22. Versuch.

29. November 1900. Ein 3622 g schwerer Hahn wurde nach der Unterbindung des Mastdarms 4 $\frac{1}{2}$  Stunden lang mit CO vergiftet und dann durch Verblutung getötet. Aus 139 g Blutes wurden erhalten: 0,2815 g Zinksalz.

Aus 22 ccm. Harns, den das Thier während der Vergiftung geliefert hat, wurden gewonnen: 0,1652 g Zinksalz.

#### a. Analyse des Zinksalzes aus dem Blute von den mit CO vergifteten Hühnern.

Zur Analyse wurden die einzelnen dargestellten Zinksalzionen vereinigt und durch Umkrystallisation aus heissem

salz zeigte die charakteristischen Formen des Zinklactates.

Zur Bestimmung des spezifischen Drehungsvermögens des Zinksalzes diente uns ein Soleil-Ventzke'scher Apparat, dessen Scala für Traubenzucker eingetheilt ist.<sup>1)</sup>

0,2249 g wasserfreies Zinksalzes, in 14 ccm. Wasser gelöst und in 200 mm. langem Rohre beobachtet, zeigten eine Drehung von  $-0,4$  Scalentheilen. Daraus ergibt sich:

$$[\alpha]_j = -6,5^\circ.$$

$$[\alpha]_D \text{ für fleischmilchs. Zink}^2): \quad [\alpha]_j \text{ für unser Zinksalz:}$$

$$-6,58-7,55^\circ \quad -6,5^\circ.$$

0,1936 g Zinksalzes verloren bei  $110^\circ$  C. 0,0250 g  $H_2O$ , entsprechend 12,91%  $H_2O$ .

0,1686 g wasserfreien Zinksalzes gaben 0,0492 g  $ZnO$  = 26,69%  $Zn$ .

0,2563 g Substanz verloren bei  $110^\circ$  C. 0,032 g  $H_2O$ , entsprechend 12,48%  $H_2O$ .

0,2243 g wasserfreie Substanz lieferten 0,0733 g  $ZnO$  = 26,34%  $Zn$ .

Berechnet	Gefunden		
für $(C_5H_7O_2)_2Zn + 2H_2O$	I	II	Mittel
$H_2O$ 12,9 %	12,91 %	12,48 %	12,52 %
$Zn$ 26,70 %	26,69 %	26,34 %	26,51 %

Die analytischen Daten und die optische Eigenschaft lassen es zweifellos erscheinen, dass das Zinksalz, das aus dem Blute von den mit CO vergifteten Hühnern dargestellt wurde, mit paramilchsaurem Zink identisch ist.

1) Die spezifische Drehung lässt sich daher leicht nach der folgenden Formel berechnen:

$$[\alpha]_j = \pm \frac{52,6 \times a}{p \times l}$$

a = die abgelesene Drehung,

p = die Gewichtsmenge Substanz in 100 ccm. Lösung,

l = die Länge des Beobachtungsrohrs,

52,6 = die spezifische Drehung des Traubenzuckers.

2) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XX, S. 374.

**b. Analyse des Zinksalzes aus dem Harn<sup>1)</sup> von den mit CO vergifteten Hühnern.**

Die einzelnen dargestellten Zinkportionen wurden vereinigt und nach der Umkrystallisation aus heissem Wasser zur Analyse verwendet. Das so gereinigte Zinksalz krystallisierte in farblosen, wohlausgebildeten Prismen, die zu Krystallkrusten vereinigt waren.

0,1062 g Substanz verloren bei 110° C. 0,0137 g H<sub>2</sub>O = 12,90 % H<sub>2</sub>O.

0,0925 g wasserfreien Salzes gaben 0,0309 g ZnO = 26,82 % Zn.

0,2317 g Substanz verloren bei 110° C. 0,0295 g an Gewicht, entsprechend 12,73 % H<sub>2</sub>O.

0,2022 g wasserfreien Zinksalzes lieferten 0,0674 g ZnO = 26,75 % Zn.

Berechnet	Gefunden		
für (C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> O <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> Zn + 2 H <sub>2</sub> O	I	II	Mittel
H <sub>2</sub> O 12,9 %	12,9 %	12,73 %	12,81 %
Zn 26,74 %	26,82 %	26,75 %	26,78 %.

0,1605 g Substanz, in 14 ccm. Wasser gelöst und in 200 mm. langem Rohre beobachtet, bewirkten eine Drehung von —0,3 Scalentheilen, entsprechend  $[\alpha]_j = -6,92^\circ$ .

$[\alpha]_D$  für fleischmilchs. Zink:  $[\alpha]_j$  für unser Zinksalz:  
 — 6,58—7,55°                      — 6,92°.

Aus den oben angeführten Analysen und der optischen Eigenschaft geht hervor, dass das aus dem Harn dargestellte Zinksalz reines Zinkparalactat ist.

Der bequemeren Uebersicht halber sind die gewonnenen Resultate in folgende Tabelle eingetragen:

---

1) Dass der Harn normaler Hühner keine nachweisbare Menge von Milchsäure enthält, haben wir durch sorgfältige Untersuchung festgestellt.

Ver- suchs- num- mer	Die Quantität des verwendeten Blutes in g	Die gefundene Menge des Zinklactates in g	Milchsäure in ‰	Die Dauer der Vergiftung
4	54	0,0296	0,0405	3 Stunden
5	87	0,1269	0,1080	5 „
6	76	0,1278	0,1244	5 „
7	63	0,0597	0,0701	5 „
8	90	0,1663	0,1366	5 1/2 „
9	50	0,0612	0,0906	3 1/2 „
10	30	0,0550	0,1357	6 1/2 „
11	34	0,1113	0,2424	7 1/4 „
12	63	0,0847	0,0989	6 3/8 „
13	49	0,0753	0,1138	5 1/4 „
14	69	0,0631	0,0677	7 „
15	67	0,0697	0,0770	3 1/4 „
16	83	0,1447	0,1291	7 1/2 „
17	46	0,0682	0,1198	4 1/2 „
18	82	0,1346	0,1215	2 1/2 „
19	89	0,1481	0,2214	7 „
20	148	0,3245	0,1623	4 „
22	139	0,2815	0,1500	4 1/2 „

Aus den in die Tabellen 1 und 2 eingetragenen Zahlen lassen sich die folgenden Mittelwerthe berechnen:

Der Gehalt des normalen  
Hühnerblutes an Milchsäure  
in ‰

0,0269

Der Gehalt des Hühnerblutes  
an Milchsäure bei CO-Vergiftung  
in ‰

0,1227.

Um die Menge der Milchsäure, die im Harne von den mit CO vergifteten Hühnern auftrat, anschaulicher zu machen,

Tabelle 3.

Versuchs- nummer	Die Quantität des verwendeten Harns in ccm.	Die gefundene Menge des Zinklactates in g	Die aus Zink- lactat umgerechnete Milchsäure in g	Die Dauer der Vergiftung
14	22	0,3083	0,2283	7 Stunden
15	10	0,0731	0,0541	3 $\frac{1}{4}$ „
16	35	0,3521	0,2608	7 $\frac{1}{2}$ „
17	22	0,1820	0,1348	4 $\frac{1}{2}$ „
18	11	0,0611	0,0452	2 $\frac{1}{2}$ „
19	30	0,1733	0,1283	7 „
20	32	0,2850	0,2111	4 „
21	24	0,1175	0,0870	3 „
22	22	0,1652	0,1223	4 $\frac{1}{2}$ „

Vergleicht man die erhaltenen Werthe für den Gehalt des normalen Hühnerblutes an Milchsäure mit den in die Tabelle 2 eingetragenen, so ergibt sich unzweideutig, dass bei der CO-Vergiftung die Milchsäure im Blute eine gewaltige Zunahme erfahren hat; dies ist auch die Ursache, dass die mit CO vergifteten Hühner stets Milchsäure in ihrem Harne ausgeschieden haben. Dass die aus dem Harne und Blute dargestellte Milchsäure mit Paramilchsäure identisch ist, haben wir mit Sicherheit bewiesen, ein Befund, der mit Angaben von Araki völlig in Einklang steht.

Ueber den Ursprung und die Entstehung der Milchsäure im Thierkörper gehen die Ansichten sehr auseinander. hauptsächlich auf die Versuchsergebnisse von Araki und Zillessen gestützt, äusserte sich Hoppe-Seyler<sup>1)</sup> folgendermassen: «Es ist endlich höchst wahrscheinlich, dass diese Verhältnisse für alle Organismen in gleicher Weise Geltung haben und Milchsäurebildung bei Abwesenheit von freiem Sauerstoff, die

1) Hoppe-Seyler, Separatabdruck aus der Festschr. d. Assist. f. Virchow, Berlin 1891.

des Sauerstoffgases eine allen lebenden Protoplasmen bei Gegenwart von Glycogen oder Glycose allgemein zugehörnde Eigenschaft darstellt.»

Minkowski<sup>1)</sup> fand, dass bei entlebten Gänsen die im Harn ausgeschiedene Menge Milchsäure nach der Fütterung mit eiweissreicherer Nahrung nicht unerheblich zunimmt, während sie von der eingegebenen Kohlenhydratmenge ganz unabhängig ist; hieraus zog er den Schluss, dass der Ursprung der Milchsäure nicht in den Kohlenhydraten, sondern in Albuminaten zu suchen ist.

In einer Arbeit, welche zur Widerlegung der Aeusserung Hoppe-Seyler's geschrieben worden ist, hat Minkowski den Nachweis erbracht, dass das Auftreten des milchsäuren Ammoniaks nach der Leberexstirpation bei Vögeln eine spezifische Folge des Fehlens der Leberfunction ist, und an die Möglichkeit gedacht, dass es sich bei der Milchsäureausscheidung im Harn beim Sauerstoffmangel, die Hoppe-Seyler und seine Schüler bei Säugethieren erkannt haben, «nicht direkt um ein Fehlen des Sauerstoffs für die Oxydation der Milchsäure handelt, sondern um eine Folge der durch den Sauerstoffmangel bedingten Ernährungsstörung der Leber.»

Wenn wir auch weit davon entfernt sind, die Milchsäureausscheidung im Harn nach der Leberexstirpation auf den Sauerstoffmangel zu beziehen, möchten wir doch eine Bemerkung zur Anschauung Minkowski's machen, nämlich, dass es durchaus nicht bewiesen ist, dass die Ursache der Milchsäurebildung beim Sauerstoffmangel in einer Ernährungsstörung der Leber zu suchen ist. Es liegen übrigens auch Beobachtungen vor, welche dafür sprechen, dass die beim Sauerstoffmangel im Organismus entstandene Milchsäure nicht mit der Ernährungsstörung der Leber im direkten nothwendigen Zusammenhang steht. So haben Nencki und Hahn<sup>2)</sup> beobachtet, dass bei Hunden mit Eck'scher Fistel und unter-

---

1) Minkowski, a. a. O.

2) Nencki und Hahn, Archiv f. experiment. Pathol. u. Pharmacol., Bd. 32, S. 161.

bundener Leberarterie keine Spur von Milchsäure in ihrem Harne auftrat. Aus Versuchen von Araki<sup>1)</sup> geht hervor, dass bei CO-Vergiftung Milchsäure stets in reichlicher Menge in den Harn übergeht, während eine der wichtigsten Functionen der Leber, die Harnstoffsynthese, durchaus nicht verhindert ist.

Es lässt sich jedoch nicht leugnen, dass die totale Exstirpation der Leber viel complicirtere Störungen im Gange der allgemeinen Functionen des Organismus hervorruft, als die Anlegung der Eck'schen Fistel und die Unterbindung der Leberarterie. Wenn aber diese complicirten Störungen der Leberfunctionen die alleinige Ursache der Milchsäureausscheidung im Harne wären, so müsste man annehmen, dass der Sauerstoffmangel die Leberfunctionen in viel höherem Grade schädigt, als die Anlegung der Eck'schen Fistel und die Unterbindung der Leberarterie, was von vorne herein sehr unwahrscheinlich ist.

Auf Grund der erwähnten Thatsachen glauben wir annehmen zu dürfen, dass der Sauerstoffmangel und die volle Entfernung der Leber zwei ganz verschiedene Momente sind, welche in gleicher Weise die abnorme Produktion der Milchsäure im Thierkörper verursachen.

Gelegentlich der Untersuchungen über die Bedeutung der Leber für das Zustandekommen der experimentellen Glycosurie hat Thiel<sup>2)</sup> beobachtet, dass die meisten Eingriffe, durch welche bei Säugethieren künstliche Glycosurien erzeugt werden können, bei Vögeln in der Regel versagten und nur in ganz vereinzelter Fällen ein Auftreten sehr geringer Mengen von Zucker im Harne zur Folge hatten. Im Anschluss an diese Beobachtungen theilen wir mit, dass wir auch den Harn von den mit CO vergifteten Hühnern stets mit negativem Resultate auf den Zucker geprüft haben.

Hingegen aus Versuchen von Araki<sup>3)</sup> ergab sich, dass das gesunde und gut ernährte Huhn bei der CO-Vergiftung

---

1) Araki, a. a. O.

2) Thiel, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. 23, S. 143.

3) Araki, a. a. O.



beobachtung hat Weintraud<sup>1)</sup> auch bei Enten gemacht. Er hat zwei gesunde Enten mit Leuchtgas vergiftet und dabei gefunden, dass die eine 0,82 g Zucker im Harne der nächsten 24 Stunden ausgeschieden hat, während die andere, die 6 mal asphyktisch gemacht worden war, nur Spuren von Zucker im Harne zeigte.

Wir zweifeln nicht im Geringsten an der Richtigkeit der Angaben von Araki und Weintraud, halten es aber für sehr wahrscheinlich, dass bei Vögeln die Glycosurie nicht als ein constantes Symptom der CO-Vergiftung resp. des Sauerstoffmangels betrachtet werden kann, wie die Milchsäureausscheidung. Ob die Milchsäureausscheidung im Harne mit der Zuckerbildung im Organismus in keinem Zusammenhang steht, ob die Milchsäure ihre Entstehung lediglich Eiweisskörpern zu verdanken hat, darüber lässt sich vorläufig nichts Sicheres sagen.

---

<sup>1)</sup> Weintraud, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. 37, S. 310.

## Ueber den Zucker im normalen Hühnerblute.

Von

S. Saito und K. Katsuyama.

(Aus dem medicinisch-chemischen Institut der Kaiserl. Universität Kyoto.)

(Der Redaction zugegangen am 23. Januar 1901.)

Durch die Untersuchungen von Seegen, Miura und Pickardt ist es bereits zweifellos gemacht, dass der im Blute des Hundes und Rindes vorhandene Zucker mit d-Glucose identisch ist. Dagegen liegen über die Natur des Zuckers im normalen Vogelblute bisher nur spärliche Angaben vor.

Gelegentlich der Untersuchung über den Pankreasdiabetes der Vögel hat Weintraud<sup>1)</sup> eine grosse Anzahl von Zuckerbestimmungen im normalen Entenblute ausgeführt. Er gibt an, in 11 Versuchen 0,132—0,198% Zucker gefunden zu haben. Da er aber nichts Weiteres in seiner Abhandlung angab, als: «Die Bestimmungen wurden nach der Abel'schen Methode nach Beseitigung des Eiweisses mittelst alkoholischer Zinkacetatlösung gemacht, meist an 30—40 g Blut, das in den späteren Versuchen immer erst nach vorausgegangenem 24stündigen Hungern den Thieren entnommen wurde», so ist es nicht möglich, ein Urtheil darüber zu gewinnen, ob er wirklich d-Glucose analysirt hat.

Kausch<sup>2)</sup> versuchte den Zuckergehalt des Blutes normaler Enten und Gänse festzustellen und sah, dass derselbe bei verschiedener Diät zwischen 0,12—0,18% schwankt. Ueber die Natur seines Zuckers hat Kausch Folgendes angegeben: «Mit dem enteweissten Blut normaler Vögel wurde öfters die «Osazonprobe angestellt, die stets einen ziemlichen Niederschlag von Krystallen ergab, welche unter dem Mikroskop

<sup>1)</sup> Weintraud, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XXXIV, S. 309.

<sup>2)</sup> Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. XXXVII, S. 283.

«Bestimmungen wurden bisher mangels genügender  
«Menge noch nicht ausgeführt. Im Saccharimeter wurde  
«bald Drehung 0, bald Spur Rechtsdrehung gefunden,  
«doch fiel letztere noch in die Fehlergrenzen des  
«benutzten Apparates. Auch die Gährfähigkeit durch  
«*Saccharomyces apiculatus* wurde mehrfach nachgewiesen.»

Diese Beobachtungen sprechen nur für die Gegenwart  
von einem gährfähigen Zucker im normalen Vogelblute; welcher  
Art dieser Zucker sein soll, darüber ist leider keine völlige  
Klarheit vorhanden. Um diese Lücke auszufüllen, haben wir  
die nachstehenden Versuche angestellt.

Das Blut wurde stets aus den Halsgefäßen von den mit  
Reis gefütterten Hühnern entnommen und durch das Ver-  
fahren von Abeles<sup>1)</sup> enteiweisst. Wir haben den Zucker  
im eiweissfreien Filtrat erstens durch Reduction einer auf  
Traubenzucker titrirten Fehling'schen Kupferlösung und  
zweitens mittelst eines für die Bestimmung von Traubenzucker  
construirten Polarisationsapparates von Soleil-Ventzke be-  
stimmt. Wir haben ferner Osazon dargestellt und dessen  
Schmelzpunkt bestimmt. Um uns volle Gewissheit zu verschaffen,  
haben wir endlich die Gährfähigkeit durch Bierhefe untersucht.

### 1. Versuch.

In 155 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,250 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,250 „ „

Das in bekannter Weise dargestellte Osazon krystallisirte  
in gelben Nadeln und schmolz bei 204° C.

### 2. Versuch.

In 102 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,208 „ „

Das Osazon besass alle Charaktere des Glucosazons und  
schmolz bei 204° C.

---

<sup>1)</sup> Abeles, Zeitschrift f. physiolog. Chemie, Bd. XV, S. 435.

### 3. Versuch.

In 28 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,220 „ „

Die Portion, welche zur Untersuchung mit dem Saccharimeter verwendet wurde, wurde hier ebenso, wie bei den Versuchen 4—8 gleich zur Titrirung benutzt.

### 4. Versuch.

In 28 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,208 „ „

### 5. Versuch.

In 29 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,192 „ „

### 6. Versuch.

In 25 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,188 „ „

### 7. Versuch.

In 35 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,200 „ „

### 8. Versuch.

In 33 g Blut wurden gefunden:

Mit dem Polarisationsapparate . . . . .	0,200 % Zucker.
Durch die Reduction der Fehling'schen Lösung . .	0,208 „ „

### 9. Versuch.

193 g Blut wurden nach der Enteiweissung auf kleines Volumen verdunstet, mit Essigsäure schwach angesäuert und dann zur Gährungsprobe verwendet.

Das bei der Gährung entwickelte Gas wurde durch eine Kalikugel vollständig absorbirt. Die vergohrene Flüssigkeit wurde in einem Kolben der Destillation unterworfen; das Destillat gab Jodoformreaction und mit  $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{K}_2\text{CrO}_4$  Aldehydreaction.

Zucker durch Bierhefe in Kohlensäure und Alkohol zerlegt wurde.

Die gewonnenen Resultate stellen wir übersichtlich in folgender Tabelle zusammen:

Tabelle.

Versuchs-Nr.	Die Quantität des verwendeten Blutes in g	Die gefundenen Mengen des Zuckers in Procent.		Bemerkungen.
		Mit dem Polarisations-apparate	Durch die Titrirung	
1	155	0,250	0,250	Das Osazon schmilzt bei 204° C.
2	102	0,200	0,208	Das Osazon schmilzt bei 204° C.
3	28	0,200	0,220	
4	28	0,200	0,208	
5	29	0,200	0,192	
6	25	0,200	0,188	
7	35	0,200	0,200	
8	33	0,200	0,208	
9	—	—	—	Durch Gährung wird der Zucker in CO <sub>2</sub> und Alkohol zerlegt.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, decken sich die Mengen des durch die Titrirung, wie des durch die polarimetrische Bestimmung gefundenen Zuckers nahezu vollständig; die Phenylhydrazin- und Gährungsprobe zeigen auch übereinstimmend, dass der Zucker mit d-Glucose identisch ist. Es lässt sich nicht mehr verkennen, dass das normale Hühnerblut d-Glucose als einen constanten Bestandtheil enthält. Die in die Tabelle eingetragenen Ziffern machen ferner zweifellos, dass bei Hühnern der Gehalt des Blutes an Zucker viel höher ist, als bei Hunden und Kaninchen.

Kyoto, den 14. December 1900.

# **Ueber den Einfluss einiger harntreibender Mittel auf die Ausscheidung von Alkalien im Harn.**

## **II. Mittheilung.**

Von

**K. Katsuyama.**

---

(Aus dem medicinisch-chemischen Institut der Kaiserl. Universität zu Kyoto.)

(Der Redaction zugegangen am 28. Januar 1901.)

---

Die nachfolgende Arbeit, welche im Anschluss an meine erste Mittheilung<sup>1)</sup> «Ueber den Einfluss des Theins auf die Ausscheidung von Alkalien im Harn» ausgeführt wurde, befasst sich mit einer Untersuchung über die Einwirkung von Harnstoff und Diuretin. Ich verweise, was die Versuchsanordnung und die Methoden zur Bestimmung der Alkalien anbetrifft, auf die erste Mittheilung und erwähne hier nur, dass die Chlorbestimmungen genau nach der Vorschrift von Volhard ausgeführt wurden.

### **I. Versuche mit Harnstoff.**

#### **1. Versuch.**

Einem kräftigen Kaninchen von 2677 g Körpergewicht wurde vom 15. Juni 1898 2 Uhr Nachmittags ab die Nahrung entzogen. Am 18. Juli erhielt das Thier 2,6575 g Harnstoff in 10 ccm. Wasser gelöst in den Magen eingespritzt. Die folgende Tabelle weist die erhaltenen Resultate auf.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVIII, S. 587.

Hungertag	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkung
1.	2572	80	alkalisch	1,021	0,6598	0,0963	0,3892	0,0184	
2.	2440	46	»	1,027	0,6800	0,0724	0,3416	0,0751	
3.	2362	40	sauer	1,027	0,5324	0,0809	0,2337	0,0858	
4.	2256	83	»	<b>1,026</b>	<b>0,7118</b>	<b>0,2428</b>	<b>0,2853</b>	<b>0,1375</b>	Harnstoff
5.	2215	38	»	1,035	0,4792	0,1171	0,2264	0,0637	

## 2. Versuch.<sup>1)</sup>

Vom 20. Juni 1898 2 Uhr 25 Min. Nachm. ab wurde ein Kaninchen von 1950 g Körpergewicht auf absolute Care gesetzt. Am 23. Juni 2 Uhr 55 Min. Nachm. wurden 2,6497 Harnstoff in 10 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen injicirt. Ich fasse die gewonnenen Resultate übersichtlich der folgende Tabelle zusammen.

Tabelle 2.

Hungertag	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkung
1.	1852	46	sauer	1,034	0,5143	0,0852	0,2625	0,0521	
2.	1785	38	»	1,037	0,6551	0,0512	0,2485	0,1385	
3.	1722	37,5	»	1,040	0,5961	Spur	0,2882	0,0737	
4.	1642	60	»	<b>1,036</b>	<b>0,6603</b>	<b>0,2896</b>	<b>0,0290</b>	<b>0,3169</b>	Harnstoff
5.	1569	30	»	—	0,4025	0,0674	0,1831	0,0599	

## 3. Versuch.

Ein kräftiges Kaninchen von 2936 g Körpergewicht wurde vom 19. Juni 1900 10 Uhr 10 Min. Vorm. ab der absoluten Care unterworfen. Am 22. Juni 10 Uhr 30 Min. Vorm. wurden 5 Harnstoff in 10 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen eingespritzt. Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Resultate.

<sup>1)</sup> Die oben mitgetheilten 2 Versuche habe ich in Gemeinschaft mit den Herren Kuwahara und Seno ausgeführt und bereits in der Zeitschrift der medicinischen Gesellschaft zu Tokyo publicirt.

Tabelle 3.

Hungertag	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkungen
1.	2795	67	sauer	1,024	0,6771	Spur	0,3943	0,0278	
2.	2663	59	»	1,026	0,4844	»	0,2665	0,0328	
3.	2575	42	»	1,033	0,4497	»	0,2605	0,0199	
4.	2457	64	»	1,027	0,4927	0,1710	0,2356	0,0631	Harnstofftag
5.	2389	20	»	1,044	0,1773	0,0496	0,1098	0,0129	

Wie aus den geschilderten Versuchsergebnissen ersichtlich ist, lässt sich stets am Harnstofftage eine Zunahme des Chlors und der Alkalien, besonders des Natrons, im Harne erkennen. Demnach darf man wohl annehmen, dass der Harnstoff einen ähnlichen Einfluss auf die Ausscheidung des Harnchlors und der Harnalkalien ausübt, wie das Thein (wenigstens bei Hungerkaninchen).

## II. Versuche mit Diuretin.

### 4. Versuch.

Vom 16. Juni 1900 11 Uhr 30 Min. Vorm. ab wurde einem 2736 g schweren Kaninchen die Nahrung entzogen. Am 19. Juni 11 Uhr 55 Min. Vorm. wurden 2 g Diuretin in 10 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen eingespritzt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 4.

Hungertag	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berechnet g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkungen
1.	2588	80	neutral	1,020	0,5775	Spur	0,3437	0,0172	
2.	2492	50	sauer	1,028	0,5955	»	0,3385	0,0311	
3.	2387	47	»	1,033	0,5994	»	0,3180	0,0588	
4.	2212	151	alkalisch	1,018	1,9844	0,8437	0,6994	0,4639	Diuretin tag
5.	2129	37	sauer	1,034	0,3811	0,0165	0,2135	0,0225	



Vom 22. Juni 1900 1 Uhr 50 Min. Nachm. ab wurde ein kräftiges Kaninchen von 2877 g Körpergewicht auf die absolute Carenz gesetzt. Am 25. Juni 2 Uhr 10 Min. Nachm. wurden 2 g Diuretin in 10 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen eingespritzt. Das Weitere zeigt die Tabelle.

Tabelle 5.

Hungertag	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berech- net g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkungen
1.	2762	53	sauer	1,029	0,4911	Spur	0,2484	0,0516	Diuretin tag
2.	2678	40	»	1,033	0,4418	—	0,2654	0,0111	
3.	2590	41,5	»	1,035	0,4766	—	0,2411	0,0501	
4.	2430	99	alkalisch	1,026	1,7737	0,3973	0,5057	0,5151	
5.	2332	42	sauer	1,035	0,3255	0,0110	0,1574	0,0414	

## 6. Versuch.

Vom 12. Juli 1900 2 Uhr 10 Min. Vorm. ab wurde ein Kaninchen von 2732 g Körpergewicht auf die absolute Carenz gesetzt. Am 15. Juli 10 Uhr 40 Min. Vorm. erhielt das Thier 2 g Diuretin in 10 ccm. Wasser gelöst, in den Magen injicirt. Die erhaltenen Versuchsergebnisse trage ich in folgende Tabelle ein.

Tabelle 6.

Hungertag	Körpergewicht g	Harnmenge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berech- net g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkungen
1.	2583	83	alkalisch	1,014	0,4033	Spur	0,2375	0,0140	Diuretin tag
2.	2490	43	sauer	1,027	0,3902	—	0,2461	0,0470	
3.	2420	39	»	1,030	0,3839	—	0,2296	0,0104	
4.	2283	82	alkalisch	1,030	0,6007	0,1578	0,2469	0,1108	
5.	2212	38	sauer	1,033	0,3727	—	0,2165	0,0155	

# 7. Versuch.

Vom 23. Juli 1900 10 Uhr 15 Min. Vorm. ab wurde ein Kaninchen von 2631 g Körpergewicht der absoluten Carenz unterworfen. Am 26. Juli 10 Uhr 45 Min. Vorm. wurden 2 g Diuretin in 10 ccm. Wasser gelöst dem Thiere in den Magen injicirt. Die am Thiere gewonnenen Resultate habe ich übersichtlich in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 7.

Hungertag	Körper- gewicht g	Harn- menge ccm.	Reaction	Spec. Gewicht	Alkalien als Chlor- alkalien berech- net g	Chlor g	K <sub>2</sub> O g	Na <sub>2</sub> O g	Be- merkungen
1.	2510	58	sauer	1,030	0,6392	0,0607	0,3996	0,0030	
2.	2426	36	»	1,037	0,5588	Spur	0,3119	0,0340	
3.	2364	34	»	1,039	0,4314	—	0,2231	0,0415	
4.	2182	132	alkalisch	1,019	2,3746	1,3596	0,8679	0,5291	Diuretinag
5.	2023	57	sauer	1,027	0,6407	0,0110	0,4052	0,0016	

Die in den Tabellen zusammengefassten Versuchsergebnisse lehren, dass die Zunahme der Harnsecretion stets eine Abnahme der sauren Harnreaction bis zum Uebergang in eine alkalische zur Folge hat, ein Befund, der mit Angaben von Rüdel<sup>1)</sup> völlig übereinstimmt. Auch aus den angeführten Versuchsreihen ergibt sich die Thatsache, dass das Diuretin die Steigerung der Chlor- und Alkaliausscheidung im Harn von Hungerkaninchen bewirkt.

Bunge<sup>2)</sup> hat den Nachweis erbracht, dass die Zuführung von phosphorsaurem oder citronensaurem Kali in dem Organismus eine erhebliche Steigerung der Chlorausscheidung im Harn zur Folge hat. Dass aber ausser durch Zuführung von Kalisalzen auch durch die harntreibenden Mittel dem Organismus Chlornatrium entzogen werden kann, habe ich bereits auf experimentellem Wege bewiesen. Es ist auch nicht zweifelhaft, dass die Kaliausscheidung im Harn nach

1) Rüdel, Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmacol., Bd. 30, S. 41.

2) Bunge, Lehrb. d. physiol. Chemie, Leipzig 1898, S. 101.

Eingabe von diuretischen Mitteln manchmal eine nicht unerhebliche Zunahme erfährt. Man darf wohl daraus schliessen, dass die Wirkungen, die zur Steigerung der Ausscheidung des Harnchlors und der Harnalkalien führen, allen Diureticis gemeinsam sind. Inwieweit das Alkalischwerden des sauren Harnes, das sich oft beim Eintritt einer reichlichen Diurese beobachten lässt, mit gesteigerter Alkaliausscheidung in Zusammenhang steht, muss durch weitere Untersuchungen entschieden werden.

Kyoto, den 29. October 1900.

=====

# Die Constitution des Thymins.<sup>1)</sup>

Von  
H. Stendel.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 26. Januar 1901.)

In meiner vorigen Mittheilung<sup>2)</sup> hatte ich angegeben, dass man durch Nitrirung des Thymins und nachfolgende Reduction zu einem Körper gelangen kann, der die Weidel'sche Reaction mit Chlorwasser und Ammoniak gibt und damit also sich als ein Pyrimidinderivat erweist. Man erhält diesen Körper auf folgende Weise:

Eine Mischung von 20 ccm. concentrirter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 30 ccm. rauchender Salpetersäure wird auf etwa  $70^\circ$  erwärmt und dann auf einmal 10 g Thymin hinzugefügt. Man fährt dann vorsichtig mit dem Erwärmen fort, bis die lebhaft Gasentwicklung aufgehört hat, lässt erkalten und verdünnt mit 150 ccm.  $\text{H}_2\text{O}$ . Ein Theil des Reactionsproductes krystallisirt schon jetzt beim Stehen aus, eine weitere Menge gewinnt man, wenn man die saure Reaction der Flüssigkeit mit  $\text{NaOH}$  abstumpft. Der gewonnene Körper ist in kaltem  $\text{H}_2\text{O}$  sehr schwer löslich, etwas leichter in heissem Wasser, leicht in Ammoniak und lässt sich hieraus bequem umkrystallisiren. Er enthält kein Krystallwasser. Als Resultate der Analysen habe ich erhalten:

0,1370 g	gaben	0,1548 $\text{CO}_2$	und	0,0336 $\text{H}_2\text{O}$ .
0,1388 g	>	0,1552 $\text{CO}_2$	>	0,0362 $\text{H}_2\text{O}$ .
0,1332 g	>	v = 41,2 ccm. N	bei t = 16 und p 75,6 (Dumas).	
0,1332 g	>	v = 41,8 ccm. N	> t = 17 > p 75,1	>
Gefunden:		Berechnet für $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_2$		
C:	30,82	30,51		30,74
H:	2,7	2,9		2,6
N:	36,13	36,06		35,95.

1) Vorläufig mitgetheilt in den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften in Marburg. Sitzung vom 23. Januar 1901. Chem. Centralblatt 1901, I, 443.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 539.

nenne, wurde nicht weiter untersucht, sondern gleich der Reduction mit Zinn und Salzsäure unterworfen.

In 15 ccm. 25%iger HCl wurde allmählich 1,0 Nitrothymin eingetragen und dann unter Kühlung 2 g Zinn hinzugefügt. Nach 24stündigem Stehen wurde das Zinn durch  $H_2S$  und die Salzsäure durch mehrfaches Abdampfen auf dem Wasserbade bis zur Trockne entfernt, dann der Rückstand mit wenig Wasser aufgenommen. Durch Ammoniak liess sich nun eine in feinen Nadeln krystallisirende Base fällen, die in Wasser leicht löslich war und mit Chlorwasser und Ammoniak die Alloxanreaction in sehr intensiver Weise gab. Zu einer zuverlässigen Analyse reichte die erhaltene Menge nicht aus; der Hauptzweck der Untersuchung war aber damit erreicht. Es stand nunmehr fest, dass das Thymin sicher den von Kossel<sup>1)</sup> vermutheten Pyrimidinkern besass, und ich konnte mich weiter zur Feststellung der Gruppierung der übrigen Atome im Molekül wenden.

Es war analog der Spaltung des Alloxans in Harnstoff und Kohlensäure durch Oxydation zu erwarten, dass man auch beim Thymin das eine Bruchstück des Pyrimidinringes in Form von Harnstoff oder eines substituirten Harnstoffs durch Oxydation erhalten würde. Diese Vermuthung hat sich nun experimentell bestätigen lassen, man erhält in der That durch Oxydation des Thymins reinen Harnstoff. Als Oxydationsmittel wählte ich das Baryumpermanganat, da es den grossen Vorzug hat, dass man leicht sämtliche Bestandtheile desselben aus der Reactionsflüssigkeit wieder herausschaffen kann.

2 g Thymin wurden in 100 ccm. heissem Wasser gelöst und allmählich eine Lösung von 6 g Baryumpermanganat in 150 ccm. Wasser (auf 1 Molekül Thymin 3 Atome O berechnet) hinzugefügt. Nach zweistündigem Stehen hatte sich die Flüssigkeit entfärbt, sie reagirte jetzt neutral und wurde nach Entfernung des Manganoxydes bei gelinder Wärme eingeeengt, von sich ausscheidendem oxalsauren und kohlsauren Baryt

---

<sup>1)</sup> Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XXVII, S. 2218.

getrennt und wiederholt mit Alkohol extrahirt. Aus der verdunsteten alkoholischen Lösung schieden sich nun Krystalle ab, die, in  $H_2O$  leicht löslich, mit Oxalsäure und Salpetersäure die bekannten schwerlöslichen krystallinischen Niederschläge gaben, im trockenen Reagensglase erhitzt, unter Gasentwicklung schmolzen, ein krystallinisches Sublimat und eine beim Erkalten porzellanähnlich erstarrende Schmelze lieferten. Diese gab, im Wasser gelöst, mit Natronlauge und Kupfersulfat prachtvollere Biuretreaction. Der Schmelzpunkt der Krystalle lag bei  $130^\circ$  (uncorrigirt), reiner Harnstoff schmilzt bei  $132^\circ$ <sup>1)</sup>.

Durch diese Untersuchung ist also bewiesen, dass auf der einen Seite des Pyrimidinringes sich die Elemente des Harnstoffs befinden, gleichzeitig ist aber, wenn man die Resultate früherer von Kossel und mir gefundener Beobachtungen zu Hülfe nimmt, auch der Aufbau der anderen Hälfte des Pyrimidinkernes aufgeklärt. Folgende Ueberlegungen werden dies leicht zeigen:

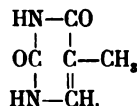
Durch Chlorirung des Thymins gelangt man zu dem Dichlorthymin,<sup>2)</sup>  $C_5H_4N_2Cl_2$ , in dem 2 Hydroxylgruppen durch Chlor ersetzt sind; es muss also im Thymin je ein Sauerstoffatom einem Wasserstoffatom benachbart sein. Man kann nun dem noch zu vertheilenden Sauerstoffatom sowohl den Platz 4 wie 6 des Pyrimidinkernes anweisen, das ist für die folgenden Betrachtungen gleichgültig, da die entstehenden Körper identisch sein würden. Ich nehme also bei 6 eine Sauerstoffbindung an auf Grund der Chlorirungsergebnisse und behalte zur Vertheilung der noch übrig bleibenden Methylgruppe sowie des einen Wasserstoffatoms nur noch die beiden Plätze 4 und 5 übrig. Bei 4 kann nun aber die Methylgruppe im Thymin sicher nicht stehen, da das 4 Methyl-2,6 dioxypyrimidin bekanntlich das von Behrend<sup>3)</sup> dargestellte Methyluracil ist. Als einzige Möglichkeit für die Stellung der Methylgruppe bleibt also nur der Platz 5 übrig; als 5 Methyl-2,6 dioxypyrimidin reiht sich somit das Thymin den Ureiden,

<sup>1)</sup> Reissert, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. XXIII, S. 2244.

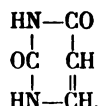
<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 303.

<sup>3)</sup> Liebig's Annalen, Bd. 229, S. 8.

formel des Thymins ist also:



Im vorigen Sommer hat Ascoli<sup>1)</sup> ferner im hiesigen Laboratorium aus Hefenucleinsäure einen Körper von der Zusammensetzung  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$  erhalten, der die Alloxanreaction<sup>2)</sup> gibt und sich vom Thymin nur durch das Fehlen der Methylgruppe unterscheidet; man wird keinen Fehlschluss thun, wenn man diesem Körper die Constitution eines 2,6 Dioxypyrimidins, des hypothetischen Uracil Behrend's,<sup>3)</sup> zuschreibt, dessen Formel ist:



Da durch vorstehende Untersuchungen das Thymin jetzt in nahe Beziehung zu den Purinkörpern gerückt ist, so wird die Erforschung des Verhaltens der Pyrimidinderivate im Organismus von grosser Bedeutung sein. Die Versuche hierüber sind aber noch nicht abgeschlossen, ich habe bis jetzt nur constatiren können, dass an einen Hund verfüttertes Methyluracil unverändert im Harn wiedererscheint, Thymin dagegen als Harnstoff auftritt.

Weitere Fütterungsversuche mit anderen Pyrimidinderivaten und Ureiden behalte ich mir vor und ich werde über die gewonnenen Resultate und die sich daraus ergebenden Folgerungen demnächst berichten.

Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Gräfin Bose-Stiftung ausgeführt.

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 161.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 541.

3) Liebig's Annalen, Bd. 229, S. 11.

# Ueber die Paranucleinsäure aus Casein. I.

Von  
**E. Salkowski.**

(Aus dem chem. Laboratorium des pathol. Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 1. Februar 1901.)

Nach Analogie mit dem Nuclein hat man vielfach stillschweigend angenommen, dass das Paranuclein oder Pseudonuclein des Caseins eine Verbindung von Eiweiss mit einer Paranucleinsäure sei, indessen ist es bisher nicht gelungen, diese hypothetische Paranucleinsäure darzustellen, wenn auch die Reactionen, welche A. Wildenow<sup>1)</sup> mit einem aus dem Paranuclein dargestellten Niederschlag erhalten hat, und die ich in Gemeinschaft mit M. Hahn<sup>2)</sup> wenigstens zum Theil bestätigen konnte, auf die Existenz einer Paranucleinsäure hinzudeuten scheinen.

Nach Analogie mit dem Nuclein würde naturgemäss der Versuch, die Paranucleinsäure darzustellen, von dem Paranuclein auszugehen haben, und zwar hätte man — wiederum nach Analogie mit dem Nuclein — das Paranuclein mit Alkalien zu behandeln. Dieser Versuch ist von vornherein fast aussichtslos, weil sich aus dem Paranuclein beim Behandeln mit Alkalien äusserst leicht Orthophosphorsäure abspaltet. Wie M. Hahn und ich (l. c. S. 47) nachgewiesen haben, geschieht dieses schon bei einstündigem Erhitzen einer Lösung von Paranuclein in 2%iger Natronlauge im Wasserbad, ja, die phosphorhaltigen Verdauungslösungen aus Casein werden, wie ich schon im

---

<sup>1)</sup> Zur Kenntniss der peptischen Verdauung des Caseins. Inaug.-Dissert. Bern 1893.

<sup>2)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. 59, S. 225. l. c. S. 247.



wiss nur eine sehr schwache Alkaliwirkung zuschreiben kann, ihres Phosphorgehalts beraubt. Dieser Weg ist also ungangbar.

Dagegen schien sich ein anderer Weg nach meinen Beobachtungen über die Verdauung des Caseins der Kuhmilch durch Pepsinsalzsäure zu eröffnen. Während die alte Lehre über die Einwirkung der Pepsinsalzsäure auf Casein dahin ging, dass dasselbe hierbei in einen unlöslichen phosphorhaltigen Antheil, das Paranuclein, und in phosphorfreie Albumose gespalten wird oder mit anderen Worten, dass der gesammte Phosphor des Caseins in dem unlöslich ausgeschiedenen Paranuclein enthalten sei, konnte ich zeigen, dass bei der Verdauung regelmässig der bei Weitem grösste Theil des Phosphors in Lösung geht, nur ein kleiner Theil im ungelösten Rückstand enthalten ist, ja, dass sich unter besonders günstigen Umständen das Casein völlig mit seinem ganzen Phosphorgehalt löst, ohne dass dabei Orthophosphorsäure abgespalten wird.<sup>1)</sup> Die Vermuthung, dass diese Verdauungslösungen Paranucleinsäure enthalten möchten, lag nahe.

Man konnte nun zunächst daran denken, durch schwache Pepsinverdauung Paranuclein darzustellen und dieses dann einer energischen Verdauung zu unterwerfen, um so von vornherein stark phosphorhaltige Lösungen zu erhalten, in welchen dann die Paranucleinsäure zu suchen war, indessen stellen einerseits die physikalischen Eigenschaften des Paranucleins einer Darstellung im grösseren Maassstab erhebliche Schwierigkeiten entgegen, andererseits ist dasselbe, einmal dargestellt und gereinigt, sehr schwer verdaulich. Ich habe es deshalb vorgezogen, von der Verdauungslösung des Caseins selbst auszugehen, obwohl die Aussichten für die Darstellung der Säure wegen der grösseren Quantität der begleitenden Albumosen offenbar ungünstiger waren.

Es wurden Versuche mit verschiedenen Metallsalzen ge-

---

1) Centralbl. f. d. med. Wissensch. 1893, Nr. 23 und 28, sowie die oben citirte Arbeit von M. Hahn und mir, ferner Pflüger's Archiv, Bd. 63, S. 405.

macht, in der Hoffnung, dass sich eines finden werde, welches die Paranucleinsäure ausfällt. Als Resultat dieser Versuche ergab sich, dass diese Eigenschaft unter bestimmten Bedingungen den Ferrisalzen zukommt. Eine aus dem Casein durch 2—3 tägige Verdauung erhaltene genau neutrale Lösung bleibt bei Zusatz einer nicht zu concentrirten Lösung von Eisenammonalaun unverändert oder zeigt nur eine geringe Trübung. Erhitzt man dann aber zum Sieden oder einige Zeit auf dem Wasserbad, so scheidet sich ein phosphorhaltiger Eisenniederschlag aus. Die Aehnlichkeit mit der Phosphorleischsäure von Siegfried liegt dabei auf der Hand. Auch andere Ferrisalze verhalten sich ähnlich, z. B. Eisenchlorid, aber nicht alle; so erhält man z. B. bei Anwendung von Ferrum oxydat. saccharat. der Pharmac. German. III keinen Niederschlag. Der Niederschlag hat nur bei einem gewissen, nicht zu geringen Eisenzusatz filtrirbare Form, bei einem zu geringen Zusatz entsteht nur eine stark trübe Flüssigkeit, deren Filtration bald gänzlich stockt.

Es ergab sich nun also die Aufgabe, die passenden Mengenverhältnisse zwischen Caseinverdauungslösung und Ferriammonsulfat zu ermitteln, und zwar ging mein Bestreben dahin, sämmtlichen organischen Phosphor auszufällen und den Niederschlag in einer gut filtrirbaren Form zu erhalten. Dieses ist nach meinen Versuchen mit Bestimmtheit zu erreichen, wenn man auf die neutralisirte Verdauungslösung<sup>1)</sup> aus 30 g lufttrocknem Casein, deren Volumen mindestens 1 Liter<sup>2)</sup> betragen muss, 200 ccm. einer 5%igen Lösung von Ferriammonsulfat verwendet (10 g des Salzes von der Formel  $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 + 12 \text{H}_2\text{O}$ ). Das Filtrat ist alsdann stets so gut wie P-frei, dagegen enthält es Eisen, dessen Quantität nicht genauer bestimmt ist. Zum Belege dienen folgende Zahlen:

1. Filtrat und Waschwasser eines derartigen Niederschlages = 2000 ccm. — 100 ccm. in der Platinschale auf ein geringes Volumen eingedampft, dann mit 25 g Salpetermischung geschmolzen etc., Phosphor

---

1) Betreffs der Herstellung derselben siehe weiter unten.

2) Ist das Volumen geringer, so besteht die Gefahr, dass Albumosen mitgefällt werden, etwas grössere Verdünnung schadet nichts.

Die N-Bestimmung nach Kjeldahl — an 50 ccm. ausgeführt — ergab für das ganze Filtrat 2,494 g N. Von dieser Zahl ist der N-Gehalt des angewendeten Ferriammonsulfates = 0,290 g abzuziehen = 2,204 als den Albumosen angehörig. Daraus ergibt sich P:N im Filtrat = 1:262,<sup>1)</sup> während im Casein P:N = 1:18,47 ist, wenn man nach Hammarsten den P-Gehalt = 0,85 %, den N-Gehalt 15,7 % setzt.

2. Filtrat und Waschwasser eines anderen Präparates = 2000 ccm. Die P-Bestimmung in 200 ccm. ergab nur 0,001  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ , also für die ganze Quantität 0,01 = 0,0028 P, d. h. fast Null.

3. In einem dritten Filtrat wurden 0,1132  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  bestimmt = 0,0321 P.

4. In einem vierten Filtrat war die Quantität von  $\text{MgNH}_4\text{PO}_4$  so gering, dass die quantitative Bestimmung nicht lohnte.

Diese Zahlen zeigen, dass es unter Innehaltung bestimmter Versuchsbedingungen gelingt, den organischen Phosphor bis auf bedeutungslose Reste auszufällen, indessen lässt sich nicht verkennen, dass diesen Angaben doch eine gewisse Unsicherheit anhaftet, welche in der Beschaffenheit des angewendeten Caseins und der Wirksamkeit des Pepsinpräparates begründet ist. Wenn auch für mich diese Unsicherheit in Fortfall kam, da ich stets dasselbe Casein und dasselbe Pepsin anwendete, und auch sonst die Bedingungen möglichst gleichmässig einhielt, schien es mir doch wünschenswerth, einen objectiveren Anhalt für die Quantität des Eisens zu gewinnen. Als solcher ergab sich die spezifische Drehung der betreffenden Lösung. Dieses Hilfsmittel ist darum sehr bequem, weil dabei nichts von der zu fällenden Lösung verloren geht. Da die Concentrationsverhältnisse nicht sehr in Betracht kommen, jedenfalls eine grössere Verdünnung nichts schadet, so kann man das Polarisationsröhrchen zum Zweck der Fällung einerseits mit der zu untersuchenden Lösung ausspülen, andererseits nach der Beobachtung mit Wasser nach-

---

1) Auf die Frage, ob die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl für das Casein und die Caseinalbumosen richtige Werthe gibt oder nicht vielmehr, wie ich annehme, etwas zu niedrige gegenüber der Bestimmung nach Dumas, welche der Angabe von Hammarsten für den N-Gehalt des Caseins zu Grunde liegt, möchte ich hier nicht eingehen, da die Differenzen jedenfalls nur wenig in Betracht kämen.

Fällung mit Ferriammonsulfat mit der Hauptquantität der Lösung vereinigen. Die Beobachtungen wurden mit einem kleinen für Traubenzucker graduirten Halbschattenapparat bei Gasglühlicht ausgeführt, welcher unter Anwendung einer 20 cm. langen Röhre Zuckerprocente angibt. Zu den Bestimmungen wurde eine 10 cm. lange Röhre angewendet. Die Verdauungslösungen aus Casein, welche auf die weiter unten angegebene Weise dargestellt waren, drehten nun, auf das Volumen von 1 Liter gebracht, constant 2,15—2,2 Theilstriche nach links. Da zur Ausfällung des organischen Phosphors aus einer solchen Lösung 200 ccm. einer 5%igen Lösung von Ferriammonsulfat erforderlich waren, so ergibt sich daraus die Regel, dass man das Volumen der erforderlichen 5%igen Ferriammonsulfatlösung erhält, wenn man die scheinbaren Zuckerprocentemit 93 multiplicirt (dies ergibt 199,85—204,6 ccm.). Die Richtigkeit dieser Berechnung wurde durch Fällung verschiedener Caseinverdauungslösungen, welche von einer nicht bekannten Caseinquantität herstammten, bestätigt. Bei den Versuchen wurde die betreffende Lösung stets soweit verdünnt, dass sie zwischen 1,5 und 2,2 drehten; concentrirtere Lösungen wurden nicht angewendet, weil dabei die Gefahr der Mitfällung von Albumosen besteht; ob die Mengenverhältnisse sich auch für verdünntere Lösungen bewähren, habe ich nicht untersucht. Nach diesen Vorbemerkungen gehe ich zur Beschreibung der Darstellung des Eisenniederschlages über.

30 g lufttrockenes Casein<sup>1)</sup> wurden in einer Glasstöpselflasche von etwa 3 Liter Inhalt mit 2 Liter eines künstlichen Magensaftes übergossen, welcher folgendermaassen hergestellt ist: Man befreit 5 g käufliches Pepsin (von Finzelberg in Andernach a. Rh.) durch Verreiben mit Wasser und Auswaschen auf dem Filter von dem beigemischtem Milchezucker, spült den Rückstand nach Durchstossung des Filters mit salz-

---

1) Das Casein war dasselbe, welches ich schon in meiner Arbeit, Pflüger's Archiv, Bd. 63, S. 405, angewandt habe. Dasselbe enthielt damals 10,83 % Wasser, 0,35 % Fett, 1,45 % Asche. Da der Wassergehalt sich noch ebenso hoch (10,85 %) erwies, ist es nicht aufs Neue analysirt.

= 1,124 D) in einen Kolben, fügt soviel desselben salzsäurehaltigen Wassers hinzu, dass das Volumen etwa  $\frac{3}{4}$  Liter beträgt, und lässt unter vielfachem Schütteln bis zum nächsten Tage stehen. Man filtrirt, wäscht mit salzsäurehaltigem Wasser nach und füllt mit demselben bis auf 2 Liter auf. — Unter häufigem Umschütteln lässt man die Flasche 48 Stunden im Thermostaten bei 40° stehen, filtrirt von dem ausgeschiedenen Paranuclein ab, wäscht nach und dampft Filtrat + Waschwasser unter Absättigung des grössten Theils der Salzsäure mit verdünnter Natronlauge oder Natriumcarbonat auf dem Wasserbad ungefähr auf die Hälfte ein. Die Reaction der Lösung muss schwach sauer sein, unter keinen Umständen alkalisch, da sich bei alkalischer Reaction beim Abdampfen sehr leicht Orthophosphorsäure abspaltet. Beim Eindampfen scheidet sich eine minimale Quantität von Eiweissflöckchen ab (äusserst leicht löslich in verdünnter Natronlauge), von welchen abfiltrirt wird. Das Filtrat wird neutralisirt, einige Zeit stehen gelassen und, falls sich Calciumphosphat abscheidet, filtrirt. Der Sicherheit wegen prüft man auch noch eine Probe mit  $\text{NH}_3$  und  $\text{CaCl}_2$  auf Phosphorsäure; entsteht dadurch ein Niederschlag, so wird die ganze Flüssigkeit mit den genannten Reagentien versetzt, im anderen Falle ist dieses unnöthig. Die möglichst genau neutrale Lösung, deren Volumen mindestens 1 Liter betragen muss, versetzt man mit 200 ccm. 5%iger Lösung von Ferriammonsulfat — sie muss dabei klar oder fast klar bleiben — und erhitzt nun bis zum Sieden oder einige Zeit auf dem Wasserbad: es scheidet sich sehr bald unter Auftreten ziemlich stark saurer Reaction ein feinflockiger Niederschlag ab, der sich allmählich zusammenballt. Der Niederschlag wird abfiltrirt oder mit der Nutsche abgesogen — das Filtrat ist eisenhaltig und ganz klar — und so lange mit Wasser von Zimmertemperatur oder warmem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser, mit  $\text{HCl}$  und  $\text{BaCl}_2$  geprüft, absolut klar bleibt, dann mit Alkohol absolutus und Aether entwässert — dabei zugleich etwaige Spuren von Fett entfernt — und in der Reibeschale trocken gerieben.

So sind die Präparate hergestellt, welche zu den Analysen

dienten; will man den Niederschlag weiter behandeln, so fällt natürlich die Alkoholätherbehandlung fort.

Es ist mir nicht gelungen, die Eisenverbindung vollständig von Schwefelsäure zu befreien; auch wenn das Waschwasser nicht die geringste Reaction mehr mit  $\text{HCl}$  und  $\text{BaCl}_2$  gab, war doch in der salzsauren Lösung einer nicht zu kleinen Probe des Niederschlages Schwefelsäure nachweisbar. Vermuthlich rührt dieses von einer Beimischung von basisch schwefelsaurem Eisenoxyd her. Mitunter trat auch bei lange fortgesetztem Waschen, namentlich wenn das Wasser etwas zu heiss war, Dissociation ein und das Filtrat wurde trüb. Unter diesen Umständen ist es erklärlich, dass die Analysen keine vollständig übereinstimmenden Zahlen ergeben, immerhin weisen sie darauf hin, dass eine chemische Verbindung vorliegt.

#### Analytische Belege.

Bezüglich der Ausführung der Analysen bemerke ich Folgendes: Die Substanz wurde stets bei  $110^\circ$  bis zum constanten Gewicht getrocknet. C und H wurden mit Bleichromat und vorgelegtem metallischem Kupfer, N theils nach Dumas, theils nach Kjeldahl bestimmt. Die Bestimmung des Phosphors und Eisens geschah in derselben Quantität. Die Substanz wurde in einer Platinschale mit dem 30fachen Gewicht Salpetermischung (3 Theile  $\text{KNO}_3$ , 1 Theil  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) geschmolzen und einige Zeit im Schmelzen gehalten. Die wässrige Lösung der Schmelze wurde durch ein kleines aschefreies Filter filtrirt (Schleicher und Schüll Nr. 590, 9 Cm.), gut ausgewaschen, der lebhaft roth gefärbte Niederschlag wurde mit dem Filter verbrannt, der Rückstand als Eisenoxyd gewogen. In der Lösung wurde die Phosphorsäure in der üblichen Weise nach vorgängiger Fällung mit Molybdänlösung als  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  bestimmt. Die C-, H- und N-Bestimmungen sind von Dr. G. Schrader, damaligem Assistenten, ausgeführt, dem ich für seine freundliche Unterstützung bestens danke, die P- und F-Bestimmungen theils von demselben, theils von mir.

#### Präparat I.

1. 0,2307 g gaben 0,2642  $\text{CO}_2$  = 31,24% C und 0,0883  $\text{H}_2\text{O}$  = 4,25% H.
2. 0,1903 g gaben 0,2197  $\text{CO}_2$  = 31,47% C und 0,0758  $\text{H}_2\text{O}$  = 4,43% H.
3. 0,2300 g gaben 13,0 ccm. N bei  $20^\circ \text{C}$ . und 728,0 mm. B. = 9,74% N.
4. 0,3927 g gaben 0,1349  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  = 24,04% Fe.
5. 0,4828 g gaben 0,0412  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  = 2,38% P.

Diesem Präparat scheint etwas Eisenoxyd beigemischt gewesen zu sein.

- säure = 9,40% N.  
 2. 0,2704 g erforderten 7,5 ccm. Viertelnormalsäure = 9,56% N.  
 3. 0,2478 g gaben 0,0302  $Mg_3P_2O_7$  = 2,61% P und 0,0792  $Fe_2O_3$  = 22,38% Fe.  
 4. 0,2550 g gaben 0,0828  $Fe_2O_3$  = 22,51% Fe.  
 Die zugehörige P-Bestimmung ging verloren.

#### Präparat III.

1. 0,1937 g gaben 0,2281  $CO_2$  = 32,50% C und 0,0784  $H_2O$  = 4,50% H.  
 2. 0,2252 g gaben 0,2615  $CO_2$  = 31,66% C und 0,0925  $H_2O$  = 4,56% H.  
 3. 0,2270 g gaben 0,2674  $CO_2$  = 32,13% C und 0,0918  $H_2O$  = 4,49% H.  
 4. 0,1943 g gaben 16,0 ccm. N bei 17° C. und 762,5 mm. B. = 9,58% N.  
 5. 0,2346 g gaben 21,2 ccm. N bei 22,5° C. und 758,0 mm. B. = 10,16% N.  
 6. 0,3956 g gaben 0,0385  $Mg_3P_2O_7$  = 2,71% P.  
 Die zugehörige Eisenbestimmung ging dadurch verloren, dass das Eisenoxyd beharrlich durch das Filter ging.  
 7. 0,3539 g gaben 0,0327  $Mg_3P_2O_7$  = 2,58% P und 0,0966  $Fe_2O_3$  = 19,11% Fe.

#### Zusammenstellung der Analysen-Resultate.

Nummer des Präparates	C	H	N	P	Fe
I {	31,24	4,25	9,74	2,38	24,04(?)
	31,47	4,43	—	—	—
II {	—	—	9,40	2,61	22,51
	—	—	9,71	—	22,38
III {	32,50	4,50	9,58	2,71	19,11
	32,66	4,56	10,16	2,58	—
	32,13	4,49	—	—	—

Im Mittel berechnet sich folgende Zusammensetzung in Procenten:<sup>1)</sup>

C 31,90    H 4,43    N 9,72    P 2,55    Fe 21,87.

<sup>1)</sup> Die Berechnung ist in der Weise ausgeführt, dass zuerst die Mittelzahlen für jedes einzelne Präparat berechnet, dann diese Zahlen addirt und durch die Anzahl der addirten Werthe dividirt wurden.

Bezüglich der Eigenschaften der Eisenverbindung habe ich Folgendes zu bemerken:

1. Die Eisenverbindung löst sich in nicht zu stark verdünnter Salzsäure und fällt beim Neutralisiren der Lösung bis zur schwach saueren Reaction wieder aus; sie löst sich auch in Essigsäure. In stark verdünnter Salzsäure, etwa in der Concentration 2<sup>o</sup>/<sub>100</sub> HCl, ist sie fast ganz unlöslich.

2. Die Eisenverbindung ist leicht löslich in schwacher Natriumcarbonatlösung, etwa von 1—2<sup>o</sup>/<sub>100</sub> Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Die Lösung färbt sich mit Schwefelammon grün, nach einiger Zeit scheidet sich Schwefeleisen ab. Die alkalische Lösung hält sich mitunter tagelang, selbst wochenlang unverändert, in anderen Fällen scheidet sich schon nach einigen Stunden ein Niederschlag aus, der wenigstens zum Theil aus Eisenhydroxyd besteht, in jedem Fall sehr schnell beim Erhitzen. Auch in schwacher Natronlauge ist die Eisenverbindung, namentlich in feuchtem Zustand, löslich; bei Zusatz von stärkerer Natronlauge zu dieser Lösung scheidet sich ein Niederschlag aus, welcher zum grössten Theil aus Eisenhydroxyd besteht. Die Abscheidung wird durch Erwärmen befördert. Das Filtrat, welches mitunter noch Eisen enthält, bleibt bei Zusatz von BaCl<sub>2</sub> klar, trübt sich jedoch beim Erhitzen zum Sieden und scheidet momentan einen ziemlich voluminösen, flockigen Niederschlag aus. Derselbe löst sich, abfiltrirt und ausgewaschen, in Salpetersäure. Die Lösung gibt mit Molybdänlösung bei leichtem Erwärmen zuerst eine weisse Trübung, dann reichlichen gelben Niederschlag von Ammoniumphosphormolybdat. Auf die Natur dieses Barytniederschlages komme ich weiter unten noch zurück; hier sei nur bemerkt, dass die Bildung desselben eine äusserst bequeme Reaction auf Paranucleinsäure darstellt, deren ich mich vielfach zur Orientirung über das Vorhandensein oder Fehlen der Säure bei meiner Arbeit bedient habe. Bei der grossen Zersetzlichkeit der Säure unter bestimmten Verhältnissen hat sich die Möglichkeit, sich jederzeit über ihre Gegenwart orientiren zu können, als sehr angenehm erwiesen.

Auch in stärkerer Natronlauge, etwa 2<sup>o</sup>/<sub>10</sub>iger (Halbnormal-lauge) ist die Eisenverbindung leicht löslich; beim Erhitzen scheidet



theils aus Eisennhydroxyd bestent. Der organische, mit dem Eisen verbundene, phosphorhaltige Atomcomplex, der der Kürze halber Paranucleinsäure genannt werden mag, wird jedoch dabei bis zu einem gewissen Grade zersetzt; das Filtrat gibt mit  $\text{BaCl}_2$  sofort einen flockigen Niederschlag, welcher das oben angegebene Verhalten zu Salpetersäure und Molybdänlösung zeigt.

3. Sehr eigenthümlich ist das Verhalten der Eisenverbindung zu Ammoniak, welches ich genauer untersucht habe, weil ich Anfangs bei der grossen Empfindlichkeit der Paranucleinsäure gegen Natronlauge Ammoniak zur Isolirung der Säure aus der Eisenverbindung benützt habe. Aus dem Folgenden wird hervorgehen, warum ich diesen Weg wieder verlassen habe.

Suspendirt man die Eisenverbindung in Wasser und setzt allmählich Ammoniak hinzu, so löst sie sich mit Leichtigkeit zu einer klaren, tief braunrothen Flüssigkeit. Diese lässt sich, ohne eine Veränderung zu erfahren, zum Sieden erhitzen und eindampfen; beim Eindampfen auf dem Wasserbad zur Trockne bleibt ein braunroth gefärbter, durchsichtiger Rückstand, welcher sich in glänzenden Lamellen von der Porzellanschale ablöst. Das Produkt ist in Wasser unlöslich, löst sich dagegen mit grosser Leichtigkeit wieder in ammoniakhaltigem Wasser auf. Die Lösung färbt sich mit Schwefelammon grün, gibt jedoch keine Ausscheidung von Schwefeleisen; das Eisen ist also bis zu einem gewissen Grade organisch gebunden oder «maskirt».

Erhitzt man die ammoniakalische Lösung nicht, sondern lässt sie nach einiger Verdünnung tagelang stehen, so trübt sie sich, es scheidet sich ein anscheinend aus Eisenhydroxyd bestehender Niederschlag aus, das Filtrat ist klar, jedoch meistens trotz stark alkalischer Reaction etwas eisenhaltig. Versetzt man es mit Barytwasser und erhitzt zum Sieden, so scheidet sich der oben beschriebene Barytniederschlag aus, es enthält also Paranucleinsäure. Die Umsetzung ist aber eine ganz unvollständige, wie sich leicht durch Behandlung des ausgewaschenen Eisenniederschlages mit verdünnter Natronlauge und Behandeln des Filtrats mit  $\text{BaCl}_2$  oder Barytwasser nachweisen lässt.

Dieses ist der Grund, warum ich die Behandlung des Eisenniederschlag mit Ammoniak zum Zweck der Darstellung der Paranucleinsäure wieder aufgegeben habe. Uebrigens ist, beiläufig bemerkt, auch die Umsetzung mit Natronlauge, wenn man sich hinsichtlich der Concentration derselben in den Grenzen hält, welche durch die Zersetzlichkeit der Paranucleinsäure geboten sind, nicht ganz vollständig. Der gut gewaschene Eisenniederschlag enthält noch phosphorhaltige organische Substanz. Löst man ihn in Salpetersäure in der Siedehitze, so gibt die erkaltete Lösung mit Molybdänlösung Phosphorsäure-reaction. Getrocknet und geglüht hinterlässt der Niederschlag ein Gemisch von Eisenoxyd und metallisch glänzendem Eisenoxyduloxyd. Ausserdem enthält der Glührückstand auch reichlich Phosphorsäure.

---

Gleichzeitig mit der chemischen Untersuchung der Eisen-  
verbindung hat mich die Frage beschäftigt, ob dieselbe der  
Resorption vom Magendarmkanal aus leicht zugänglich ist, was  
nach der Löslichkeit in Alkalien nicht unwahrscheinlich war.  
Die Versuche wurden an Kaninchen angestellt. Als Indicator  
der Resorption diente mir der Eisengehalt der Leber. Durch  
Kontrollversuche an normalen Thieren bei derselben oder  
sehr ähnlichen Fütterung und solchen, die ähnliche Eisen-  
verbindungen erhielten, war die Frage der Resorbirbarkeit und  
des Umfanges derselben leicht zu entscheiden. Die Versuche  
wurden im Allgemeinen so eingerichtet, dass die Thiere zuerst  
des Morgens nur wenig feingehacktes Futter mit der Eisen-  
verbindung gemischt erhielten, und erst wenn sie die Mischung  
verzehrt hatten, ihr gewöhnliches Futter. Dadurch war die  
vollständige oder annähernd vollständige Aufnahme der Eisen-  
verbindung garantirt. Die Fütterungsversuche dauerten regel-  
mässig 10 Tage; nach Ablauf des 10. Tages wurde das Thier  
durch Halsschnitt getödtet, die Leber herausgenommen, aus-  
bluten gelassen, die grossen Gefässe und die Gallenblase ent-  
fernt — dabei ist ein geringer Verlust an Lebersubstanz unver-  
meidlich — dann die Leber abgespült, auf Filtrirpapier abgedrückt  
und gewogen, alsdann fein zerhackt.

weniger) dienten zur Eisenbestimmung, die dritte, von ca. 2–4 g, zur Bestimmung des Trockenrückstandes. Die beiden ersten Portionen wurden in absoluten Alkohol gebracht, der sich in breiten Glasstöpsel-Cylindern befand; es gelang mit Hülfe des Gummiwischers ohne Schwierigkeit, auch die letzten Reste des an der Platinschale hängenden Leberbreies mit absolutem Alkohol in das Glas zu bringen.<sup>1)</sup> Die Quantität des im Ganzen angewendeten Alkohols betrug etwa 150 ccm. Waren so die Vorbereitungen getroffen, so konnte die Veraschung beliebig aufgeschoben werden; mindestens blieb der Leberbrei 2 Tage unter Alkohol, meistens länger. Ich wählte dieses anscheinend umständliche Verfahren, weil es sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass die Veraschung der Leber ein sehr gutes, langdauerndes Trocknen erfordert, dieses nach der Behandlung mit Alkohol und Aether fast ganz fortfallen kann.

Zur Veraschung wurde zunächst der coagulierte Leberbrei auf einem nicht angefeuchteten aschefreien Filter gesammelt, die am Glase hängenden Reste mit Alkohol auf das Filter gespült, dann der Filterinhalt mit Aether gewaschen. Die gesammelten alkoholisch-ätherischen Auszüge wurden verdunstet und in der Platinschale verbrannt. Nach dem Erkalten wurde das Filter sammt dem Leberbrei in dieselbe Platinschale gebracht, nach einigem Stehenlassen an der Luft bei gelinder Wärme getrocknet, dann verkohlt. Die erkaltete Kohle wurde mit dem Achatpistill verrieben, die anhängenden Reste mit aschefreiem Filtrirpapier abgewischt und in die Schale gebracht, dann stärker geglüht. Die Kohle verbrennt auch bei stundenlangem Glühen nicht vollständig (nur in 2 Fällen gelang dieses annähernd). Es wurden daher stets schliesslich zur vollständigen Veraschung 7–8 g Salpetermischung in die Schale gebracht, mit Hülfe eines Glasstabes gut durchgemischt (der Glasstab mit etwas

---

1) Will man ganz sicher gehen, so kann man die Veraschung in derselben Platinschale ausführen, welche man zum Abwägen benutzt hat; das ist in einigen Fällen geschehen, war aber nicht immer angängig und ist auch nicht nöthig.

in Wasser gelöst, die Lösung filtrirt. Das Filtrat erwies sich stets vollkommen eisenfrei, es brauchte daher nicht berücksichtigt zu werden. Das sorgfältig gewaschene Filter mit Inhalt wurde getrocknet und dann in derselben Platinschale verascht.<sup>1)</sup> Der Rückstand löste sich stets leicht und vollständig in Salzsäure beim Erwärmen, mitunter unter Zurücklassung von Spuren von Filterkohle und sandigen Substanzen. Um diese zurückzuhalten und etwa vorhandene Kieselsäure zur Abscheidung zu bringen, wurde in jedem Fall die salzsaure Lösung auf dem Wasserbad verdampft, einige Zeit bei 110–120° getrocknet, nach dem Erkalten aufs Neue in Salzsäure gelöst, die Lösung verdünnt, filtrirt und nachgewaschen. Das Filtrat wurde mit 1 ccm. concentrirter Lösung von Natriumphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) versetzt, mit  $\text{NH}_3$  alkalisirt, dann mit Essigsäure angesäuert, die gelatinöse Ausscheidung von Ferriphosphat am nächsten Tage abfiltrirt, gewaschen, getrocknet, geglüht, gewogen. — Das Filtrat vom Ferriphosphat erwies sich beim Stehenlassen nach Zusatz von Ammoniak und Schwefelammon stets absolut eisenfrei.

Sämmtliche Versuche wurden gleichmässig ausgeführt; Abweichungen fanden nur in Bezug auf die Ernährung statt. Ich führe die einzelnen Versuche in der chronologischen Reihenfolge mit den Analysenzahlen kurz an.

#### Versuch 1.

Körpergewicht, nur am Ende des Versuches (bei Beginn des 11. Tages) bestimmt, 730 g. Das Thier hatte ein Gemisch von verschiedenen Kohlsorten, Mohrrüben, Kohlrüben, Kartoffeln, Hafer, Brod und Heu erhalten, jedoch augenscheinlich nicht in genügender Quantität, da es am Ende des Versuches etwas mager erschien. Dies gilt auch für den Versuch 2. In den späteren Versuchen wurde auf diesen Punkt besser geachtet und das Gewicht auch zu Beginn des Versuchs festgestellt. Mit der Nahrung erhielt das Thier pro Tag 0,25 g der Eisenverbindung = ca. 0,055 Eisen. Lebergewicht 26,5 g.

---

<sup>1)</sup> Will man eine andere Platinschale anwenden, so thut man gut, in der selbstverständlich vollkommen mit Wasser gereinigten Schmelzschale etwas Salzsäure zu erwärmen und diese Salzsäure zur Lösung des Eisenoxyds zu benutzen, da die Salzsäure nicht selten aus der Schmelzschale noch etwas Eisen aufnimmt.

#### Versuch 2.

Dieselbe Ernährung. Körpergewicht am Ende des Versuches 620 g.  
Pro Tag 0,25 der Eisenverbindung. Gewicht der Leber 19,5 g.

1. Trockenbestimmung 2,1492 g gaben 0,5546 Trockenrückstand  
= 25,81 %;

2. Eisenbestimmung: a) 8,225 g gaben 0,0066  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 7,2162 g gaben 0,0056  $\text{FePO}_4$ .

#### Versuch 3.

Normales Thier ohne besondere Vorfütterung. Körpergewicht  
750 g. Gewicht der Leber 33,5 g.

1. 3,8386 g gaben 1,0164 Trockenrückstand = 26,48 %;  
2. a) 10,1256 g gaben 0,0025  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 10,4397 g     0,0023     .

#### Versuch 4.

Normales Thier ohne besondere Vorfütterung. Körpergewicht  
1370 g. Lebergewicht 42,5.

1. 4,1933 g gaben 1,0757 Trockenrückstand = 25,65 %;  
2. 10,1401 g gaben 0,0022  $\text{FePO}_4$ , die zweite Eisenbestimmung  
ging verloren.

#### Versuch 5.

Normales Thier ohne besondere Vorfütterung. Körpergewicht  
1350 g. Lebergewicht 63 g.

1. 4,5492 g gaben 1,2366 Trockenrückstand = 27,18 %;  
2. a) 10,5240 g gaben 0,0017  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 10,7562 g     0,0016     .

#### Versuch 6.

Körpergewicht im Beginn des Versuches 1050, am Ende 1060 g.  
Ernährung wie bei 1 und 2, jedoch für reichliche Ernährung gesorgt.  
Mit der Nahrung erhielt das Thier 10 Tage lang pro Tag 0,5 g Eisen-  
atmidalbumosä (durch Fällung von Atmidalbumose mit Eisenchlorid dar-  
gestellt. Eisengehalt 4,15 %) = 0,021 Eisen. Lebergewicht 53 g.

1. 2,4968 g gaben 0,6536 Trockenrückstand = 26,18 %;  
2. a) 10,1050 g gaben 0,0026  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 10,2184 g     0,0027     .

#### Versuch 7.

Anfangsgewicht 1020, Endgewicht 950 g. Ernährung und Eisen-  
zufuhr wie bei 5. Lebergewicht 41 g.

1. 2,6972 g gaben 0,6478 Trockenrückstand = 23,47 %;  
2. a) 13,3464 g gaben 0,0036  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 13,4746 g     0,0035     .

Versuch 8.

Anfangsgewicht 1250, Endgewicht 1370 g. Das Thier erhielt pro Tag 0,1 g paranucleinsaures Eisen = 0,022 g Eisen. Lebergewicht 78 g.

1. 4,1402 g gaben 1,1490 Trockenrückstand = 27,93 %;
2. a) 11,8114 g gaben 0,0042  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 12,1726 g     "     0,0055     "     .

Versuch 9.

Anfangsgewicht 1450, Endgewicht 1410 g. Pro Tag 0,1 g paranucleinsaures Eisen. Lebergewicht 79,5 g.

1. 4,1818 g gaben 1,2318 Trockenrückstand = 29,45 %;
2. a) 10,7722 g gaben 0,0033  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 10,2902 g     "     0,0036     "     .

Versuch 10.

Anfangsgewicht 1950, Endgewicht 2105 g. Pro Tag 0,90 Ferratin (Käufliches Präparat in Originalpackung. Der Eisengehalt des lufttrockenen Präparates betrug 7,11 %) = 0,064 Eisen. Lebergewicht 91 g.

1. Trockenbestimmung aus Versehen versäumt;
2. a) 11,0984 g gaben 0,0032  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 9,1044 g     "     0,0029     "     .

Versuch 11.

Anfangsgewicht 1820, Endgewicht 1770 g. Dieselbe Quantität Ferratin. Lebergewicht 40 g (!)

1. 4,3072 g gaben 1,1866 Trockenrückstand = 27,55 %;
2. a) 8,9942 g gaben 0,0036  $\text{FePO}_4$ ,  
b) 9,1044 g     "     0,0032     "     .

Versuch 12.

Anfangsgewicht 2500, Endgewicht 2520 g. Fütterung pro Tag 50 g Hafer, 100 Weisskohl, 100 Mohrrüben, Lebergewicht 74,7 g. Die Leber ist sehr glycogenreich.

1. 2,6428 g gaben 0,8102 Trockenrückstand = 30,73 %;
2. a) 10,2064 g gaben 0,0030  $\text{FePO}_4$ ,  
c) 10,5570 g     "     0,0033     "     .

Versuch 13.

Anfangsgewicht 2490, Endgewicht 2460 g. Fütterung dieselbe wie bei Nr. 12. Lebergewicht 81,3.

1. 3,3664 g gaben 0,9696 Trockenrückstand = 28,8 %;
2. 10,4364 g     "     0,0032  $\text{FePO}_4$ .

In nachfolgender Tabelle sind die erhaltenen Resultate übersichtlich zusammengestellt.

Versuchs- thieres	Angewendetes Eisenpräparat	am Ende des Ver- suches in g	Gewicht der Leber	enthalten Eisen in mg	substan- z enthalten Eisen in mg	Leber enthält Eisen in mg	enthalten in der Leber Eisen in mg	Bemerkungen
3	0	750	33,5	8,66	32,72	2,90	3,87	} Ohne Vorfütterung
4	„	1370	42,5	8,05	31,36	3,42	2,50	
5	„	1350	63	5,74	21,15	3,62	2,68	
12	„	2520	74,7	11,28	36,60	8,44	3,33	
13	„	2460	81,3	11,37	39,48	9,24	3,76	} 10 Tage sehr reichlich gefüttert.
1	0,25 paranuckl. Eisen = 0,065 Eisen p. d.	730	26,5	26,03	98,82	6,88	9,43	
2	„	620	19,5	29,30	113,47	5,71	9,21	
8	0,1 paranuckl. Eisen = 0,022 Eisen p. d.	1370	78	15,00	53,00	11,68	8,51	
9	„	1410	79,5	11,60	39,36	9,22	6,54	
6	0,5 Eisenatmidalbum. = 0,021 Eisen p. d.	1060	53	9,62	36,68	5,02	4,81	
7	„	950	41	9,92	41,78	4,02	4,23	
10	0,30 Ferratin = 0,064 Eisen p. d.	2105	91	11,25	nicht bestimmt	10,24	4,86	
11	„	1770	40 (!)	13,90	50,56	5,56	3,14	

Die Berechnung der Mittelzahlen ergibt für den Gehalt an Eisen in mg

Eisen- präparat		100 g frische Leber enthalten	100 g Trocken- substanz der Leber enthalten	1 Kilo Thier enthält in der Leber
0	Mittel aus den drei ersten Versuchen.	7,48	28,43	3,02
	Mittel aus allen (5) Versuchen.	9,02	32,26	3,23
Para- nuclein- saures Eisen.	Mittel aus den beiden ersten Versuchen.	27,66	106,15	9,32
	Mittel aus allen (4) Versuchen.	20,48	76,88	8,421)
Eisenatmid- albumose.	—	9,77	39,23	4,53
Ferratin.	—	12,58	—	4,00

1) In einer vorläufigen Mittheil., Centralbl. f. d. med. W., 1900, Nr. 51, lautet diese Zahl 9,05 in Folge eines leider übersehenen Rechenfehlers.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass durch 10tägige Fütterung mit paranucleinsaurem Eisen der Eisengehalt der Leber ansehnlich, im Maximum etwa auf das dreifache gesteigert wird und erheblich mehr, als durch die anderen angewendeten Eisenverbindungen.

#### **Darstellung der Paranucleinsäure.**

Zur Darstellung der Säure aus der Eisenverbindung wurde in Anbetracht der Empfindlichkeit der Säure gegen Alkali zuerst versucht, die Eisenverbindung durch Salzsäure zu zersetzen und durch Alkohol zu fällen.

Der aus 30 g Casein resultirende gut ausgewaschene feuchte Eisenniederschlag wurde in 35 ccm. Salzsäure von 1,124 D gelöst und filtrirt. Das Volumen der Lösung betrug 80 ccm. Sie wurde in 320 ccm. absoluten Alkohol gegossen, die Mischung blieb vollkommen klar, nach Zusatz von 500 ccm. Aether entstand indessen ein reichlicher flockiger Niederschlag, derselbe wurde abfiltrirt und gut mit Alkohol absolutus gewaschen, dann mit Aether behandelt und in Form eines weissen, nicht hygroskopischen Pulvers erhalten, das sich äusserst leicht und ganz klar mit stark saurer Reaction in Wasser löste. .

Unerwarteter Weise enthielt die Substanz Eisen in merklicher Menge und auch Chlor. Es liegt natürlich sehr nahe, an eine Verunreinigung mit Eisenchlorid zu denken, indessen ist die Sachlage doch nicht so einfach. Versetzt man die wässrige Lösung mit Silbernitrat, so bleibt sie, abgesehen von einer minimalen Opalescenz, klar; auch Zusatz von Essigsäure ändert nichts daran. Setzt man jedoch Salpetersäure hinzu, so entsteht eine dichte weisse Trübung, erhitzt man nunmehr zum Sieden, so scheiden sich unter leichter Gelbfärbung der Flüssigkeit dicke weisse Klumpen von Chlorsilber aus. Ebenso bekommt man sofort Chlorsilber, wenn man die Lösung der Substanz in verdünnter Salpetersäure mit Silbernitrat versetzt. Es mag dahingestellt bleiben, ob die Salzsäure nur eine Verunreinigung ist oder ob es sich um eine chemische Verbindung handelt.



keinen Niederschlag gibt, auch nicht nach Zusatz von Essigsäure, beweist nicht unmittelbar, dass es sich um eine chemische Verbindung handelt, denn auch Albumoselösungen, welche Chlornatrium enthalten, geben, mit Essigsäure angesäuert, mit Silberlösung allein oft keinen Niederschlag, sondern erst nach dem Erhitzen mit Salpetersäure. Für das Bestehen einer chemischen Verbindung spricht allerdings, dass die Quantität der Salzsäure anscheinend recht beträchtlich ist, sowie folgende Beobachtung: Löst man Paranucleinsäure (die Darstellung siehe weiter unten) in Wasser, theilt die Lösung in zwei gleiche Hälften und säuert die eine Hälfte mit einigen Tropfen Salzsäure an, die andere nicht, so wird die nicht angesäuerte Probe durch Zusatz des mehrfachen Volumens Alkohol absolutus sofort gefällt, die salzsäurehaltige dagegen nicht, sondern erst nach Zusatz des gleichen Volumens Aether. Der abfiltrirte, mit Alkohol absolutus, dann mit Aether gewaschene Niederschlag verhält sich hinsichtlich seines Chlorgehaltes ganz so, wie die in Rede stehende, aus der Eisenverbindung durch Salzsäure, Alkohol und Aether erhaltene Fällung.

Da die Zersetzung mit Salzsäure sich somit als unbrauchbar, die Zersetzung mit Ammoniak als unsicher erwiesen hatte, musste ich dazu zurückkehren, die Eisenverbindung durch Natronlauge umzusetzen. Dieses Verfahren macht insofern Schwierigkeiten, als die Umsetzung der Eisenverbindung bei zu schwacher Einwirkung sehr unvollständig ist, also grosse Verluste bedingt, bei zu starker Einwirkung dagegen die Spaltung eines Theils der Paranucleinsäure oder selbst vollständige Spaltung zu befürchten ist. Glücklicher Weise lässt sich leicht erkennen, ob eine solche Spaltung stattgefunden hat. In diesem Falle gibt nämlich das Filtrat des Gemisches von Natronlauge und Eisenniederschlag bei Zusatz von  $\text{BaCl}_2$  eine Trübung resp. Niederschlag, es muss also bei dieser Prüfung ganz klar bleiben. Ich bin schliesslich bei folgenden Verhältnissen stehen geblieben.

Der feuchte Eisenniederschlag aus 30 g Casein wird mit 100 ccm. Wasser in der Reibschale zu einer ganz gleichmässigen Suspension verrieben, bei Zimmertemperatur mit

80—90 ccm. Halbnormallauge durchgerührt,<sup>1)</sup> wobei vollständige Lösung eintritt. Die Lösung wird erhitzt, bis die Umsetzung eingetreten ist, was sich an der Bildung eines im Wesentlichen aus Eisenhydroxyd bestehenden Niederschlages zu erkennen gibt, und nun möglichst schnell filtrirt (resp. abgenutscht) und zwar in einen Filtrirkolben, welcher etwa  $\frac{3}{4}$  der zur Sättigung der Natronlauge erforderlichen Quantität Essigsäure enthält, oder auch die ganze Quantität, ein- oder zweimal nachgewaschen. Von der sauer reagirenden, etwas gelblichen Flüssigkeit, in welcher eine Zersetzung der Paranucleinsäure nicht mehr zu befürchten ist, wird eine Probe abgenommen und mit Barytwasser alkalisirt; sie muss dabei klar bleiben. Wird sie flockig trüb, so ist die Operation misslungen und die Darstellung muss verworfen werden, doch kam dieses, nachdem die obigen Einzelheiten einmal ausgearbeitet waren und genau innegehalten wurden, nicht mehr vor. Das sauer reagirende Filtrat fällt man nunmehr mit Kupferacetat (ca. 5%ige Lösung), solange noch ein Niederschlag entsteht, lässt den Niederschlag absitzen und wäscht ihn einige Mal durch Decantiren,<sup>2)</sup> zersetzt durch Einleiten von  $H_2S$ , erhitzt auf dem Wasserbad zum Absetzen des  $CuS$ , filtrirt, treibt aus dem klaren Filtrat  $H_2S$  durch einen Luftstrom aus und dampft dasselbe bis auf etwa 60 ccm. ein. Das Abdampfen kann unbedenklich auf dem Wasserbad geschehen, Vacuum ist nicht erforderlich.

Man lässt nun bis zum nächsten Tage stehen, filtrirt von einer geringen Trübung ab und füllt durch Eingiessen in das mehrfache Volumen Alkohol absolutus, entwässert durch Alkohol und Aether.

Man erhält so die Substanz als feines, weisses Pulver, das sich sehr leicht mit ausgesprochen saurer Reaction in kaltem

---

<sup>1)</sup> Ursprünglich wurden nur 50 ccm. Halbnormallauge angewendet, dann, da hierbei die Lösung nicht vollständig erfolgte, noch 5—6 ccm. 15 %ige Natronlauge hinzugesetzt. — Vielleicht ist auch die Umsetzung mit Natriumcarbonat vorthellhaft.

<sup>2)</sup> Beim Waschen auf dem Filter backt der Niederschlag zusammen und muss dann zur Zersetzung mit  $H_2S$  in der Reibschale durchgerieben werden.

Sehr eigenthümlich ist das Verhalten der Substanz beim Eindampfen der Lösung auf dem Wasserbad zur Trockne, das ich zunächst anwendete, um die im Filtrate vom Schwefelkupfer vorhandene gelöste Substanz erst einmal zu Gesicht zu bekommen. Sie hinterbleibt dabei als spröde, hornartige, gelblich resp. bräunlich gefärbte Masse, welche beim Uebergiesse mit Wasser glasig aufquillt, ganz besonders dann, wenn man das Wasser in die noch heisse Schale giesst, sehr ähnlich dem Ovomucoid. Wie bei diesem löst sich die glasig gequollene Masse erst beim Erhitzen mit Wasser zum Sieden und nur allmählich. Dabei bleibt ein kleiner Rest ungelöst. Diese Erscheinung kann man, insoweit es sich um das Filtrat vom Schwefelkupfer handelt, leicht als zum Theil aus Paranuclein bestehend erweisen. Es zeigte sich aber bald, dass, wenn man das Filtrat zur Trockne dampft und den Rückstand mit Wasser zum Sieden erhitzt, wiederum ein kleiner Theil ungelöst bleibt und so fort. Diese Erscheinung machte mich Anfangs zweifelhaft, ob die erhaltene Substanz einheitlicher Natur sei. Man könnte annehmen, dass es sich um ein Gemisch von 2 Substanzen handelt, von denen die eine sich sehr langsam und nur bei wiederholtem Eindampfen abscheidet. Das ist indessen wenig wahrscheinlich, viel wahrscheinlicher, dass es zwei physikalisch verschiedene Formen der Substanz gibt und dass die hornartige Form, wie sie der Kürze halber genannt werden mag, einmal gebildet, nicht völlig wieder in die lösliche überführbar ist. In dieser Deutung werde ich dadurch bestärkt, dass ganz dieselbe Erscheinung auch beim Ovomucoid zu beobachten ist; auch bei diesem ist die hornartige Form durch Kochen mit Wasser nicht völlig in die lösliche überzuführen, es bleibt immer ein Rest ungelöst. Eine völlige Entscheidung habe ich über diesen Punkt noch nicht herbeiführen können, sie würde dadurch zu treffen sein, dass man die Lösung immer wieder aufs Neue eindampft; geht das schliesslich fast nichts mehr in die wässerige Lösung über, so ist die Richtigkeit der Erklärung dargethan.

zu einer hornartigen Masse ein, krystallisiert konnte die Substanz nicht erhalten werden.

Bezüglich der Zusammensetzung der Säure und ihrer Eigenschaften beschränke ich mich vorläufig auf folgende Angaben:

a) Zusammensetzung der direkt aus der wässerigen Lösung mit Alkohol gefällten Substanz, bei 110—115° getrocknet:

1. 0,1803 g gaben, mit Bleichromat im offenen Rohr verbrannt, 0,2840 CO<sub>2</sub> = 42,96% C und 0,1162 H<sub>2</sub>O = 7,09% H.

2. 0,1808 g gaben 21,5 ccm. N bei 18° und 750 mm. B = 13,55% N.

3. 0,352 g gaben nach der Molybdänmethode 0,0510 Mg<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 4,05% P.

b) Zusammensetzung der aus der hornartigen Modification durch Kochen mit Wasser etc. dargestellten Substanz bei 110—115° getrocknet:

1. 0,1620 g gaben 0,2525 CO<sub>2</sub> = 42,51% C und 0,1017 H<sub>2</sub>O = 6,97% H.

2. 0,1680 g gaben 19,6 ccm. N bei 16° und 740 mm. B = 13,25% N. 1)

3. 0,3569 g gaben 0,0550 Mg<sub>3</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> = 4,31% P.

#### Eigenschaften.

1. Die Substanz ist in Wasser löslich, in heissem leichter als in kaltem, die wässerige Lösung reagiert sauer und löst kohlen sauren Kalk unter Entwicklung von Kohlensäure; sie ist in Alkohol unlöslich, aus der wässerigen Lösung durch Alkohol fällbar, fast unlöslich in Eisessig.

2. Sie ist linksdrehend. Eine ca. 2%ige Lösung drehte im Laurent'schen Halbschattenapparat bei Natriumlicht im 1-Decimeterrohr 55' links. Danach berechnet sich α<sub>D</sub> zu —46°. Die Bestimmung ist nur als annähernde zu betrachten.

3. Versetzt man die 1%ige Lösung mit dem gleichen Volumen kaltgesättigtem Barytwasser und erhitzt zum Sieden, so trübt sie sich plötzlich unter Ausscheidung eines reichlichen flockigen Niederschlages, welcher sich stark P-haltig und N-haltig

---

1) Die Bestimmungen von C, H und N hat Herr Dr. C. Neuberg freundlichst für mich ausgeführt, wofür ich demselben auch an dieser Stelle besten Dank sage.

stent noch aus. Zur Reaction gehört ein gewisser Ueberschuss an Baryt; sie kann ausbleiben, wenn man stärkere Lösungen nur mit Barytwasser alkalisirt.

4. Versetzt man die 1%ige Lösung mit etwa dem gleichen Volumen Natronlauge von 1,34 D, und erhitzt einige Minuten zum Sieden oder etwa eine halbe Stunde im Wasserbad, so enthält die Lösung Orthophosphorsäure, durch Ansäuern mit HCl, Alkalisiren mit  $\text{NH}_3$  und Zusatz von Magnesiamischung nachweisbar. — Auch der oben erwähnte Barytniederschlag wandelt sich bei längerem Kochen mit Barytwasser allmählich in Baryumphosphat um.

#### Verhalten der ca. 1%igen Lösung zu Reagentien.

##### a) Fällungsreactionen:

1. Ferriammonsulfat (5%): bewirkt in der Kälte keine Trübung; beim Erhitzen zum Sieden massiger Niederschlag.

2. Eisenchlorid (3%): keine Trübung, auch nicht beim Erhitzen zum Sieden.

3. Silbernitrat (3%): 0.<sup>1)</sup>

4. Quecksilberchlorid (5%): Anfangs eine wieder verschwindende Trübung, erst bei reichlichem Zusatz bleibende Trübung, schliesslich geringer Niederschlag.

5. Kupferacetat (5%): reichlicher Niederschlag.

6. Bleiessig: ebenso.

7. Metaphosphorsäure: 0.

8. Essigsäure + Ferrocyankalium: 0.

9. Tannin: dicker Niederschlag.

10. Phosphorwolframsäure in der mit Salzsäure angesäuerten Lösung: ebenso.

11. Trichloressigsäure: erst bei reichlichem Zusatz geringe Trübung.

12. Gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung: Niederschlag.

13. Verdünntes (1:3) Eiereiweiss: Trübung.

---

1) Das Ammonsalz gibt dagegen starke Fällung.

14. Serum: <sup>1)</sup> Trübung, die sich im Ueberschuss von Serum grösstentheils löst, bei geringerem Zusatz bleibende Trübung, beim Stehen allmählich geringer Niederschlag.

15. Witte'sches Pepton: starke, im Ueberschuss zum Theil lösliche, Trübung; beim Stehen Niederschlag.

b) Farbenreactionen:

1. Biuretprobe: positiv.

2. Xanthoproteinprobe: schwach positiv. <sup>2)</sup>

3. Millon's Reaction: Trübung, die sich beim Erhitzen löst, unter Auftreten gelber, schwach röthlicher Färbung, später geringer, schwach röthlicher Niederschlag.

4. Molisch's Reaction: negativ.

5. Adamkiewicz's Reaction: negativ. <sup>3)</sup> Dabei kommt in Betracht, dass sich die Substanz fast gar nicht in Eisessig löst.

Weitere Mittheilungen hoffe ich bald machen zu können. Vor Allem soll an einem grösseren Material die Frage nach der Einheitlichkeit der Substanz geprüft werden, für welche bisher keine bestimmten Beweise vorliegen, und an welchen auch namentlich der Umstand zweifeln lässt, dass die Substanz Spuren von Schwefel enthält.

---

1) Hierzu ist ein Transsudat (Ascites) benutzt, da Blutserum gerade nicht zur Verfügung stand.

2) Die Paranucleinsäurelösung war in diesem Falle nicht 1 %ig, sondern von unbekannter Concentration.

3) Dieselbe ist mit einer kleinen Probe der Substanz direkt angestellt.

# Ueber den Verlauf der Phosphorsäureausscheidung beim Hunger

Von

Fr. N. Schulz und Dr. J. Mainzer.

(Aus der chem. Abtheilung des physiol. Instituts zu Jena.)

(Der Redaction zugegangen am 8. Februar 1901.)

Vor einiger Zeit hat der eine von uns auf Grund einer Reihe von Stickstoffbilanzversuchen die Ansicht vertreten, dass der Verlauf des Eiweissumsatzes bei absoluter Nahrungsentziehung nicht in dem gewöhnlich angenommenen Maasse von den stickstofffreien «Reservestoffen» des betreffenden Thieres abhängig sei.<sup>1)</sup> Insbesondere bezog sich diese Meinung auf die intensive Steigerung des Eiweissumsatzes kurze Zeit vor dem Tode, welche man für gewöhnlich als durch das Verschwinden des Reservefettes bedingt ansieht. Im Gegensatz zu dieser geläufigen Anschauung wurde als Ursache der prä-mortalen Steigerung des Eiweissumsatzes ein rapides Absterben von Körperzellen angesprochen, durch deren Tod grössere Mengen eines dem Nahrungseiweiss äquivalenten Materials in die Circulation gelangen könnten.

Zur weiteren Begründung dieser Theorie, die von mehreren Seiten aus einer experimentellen Prüfung zugänglich erscheint, wurde zunächst neben dem Stickstoffumsatz der Phosphorumsatz mit in den Bereich der Betrachtung gezogen.

«Ueber den Phosphorsäurestoffwechsel unter normalen und pathologischen Verhältnissen» liegt ein zusammenfassendes

---

<sup>1)</sup> Fr. N. Schulz, Ueber das Wesen der prä-mortalen Stickstoffsteigerung. Münchener med. Wochenschrift 1899.

Derselbe, Beiträge zur Kenntniss des Stoffwechsels bei unzureichender Ernährung. Pflüger's Archiv, 1899, Bd. 76, S. 379—410.

Referat von P. Bergell<sup>1)</sup> vor, auf welches zur Vermeidung einer Wiederholung des dort Gesagten hinsichtlich der Litteratur im Wesentlichen verwiesen werden soll.

Der Gedanke, der den im Nachfolgenden mitzutheilenden Versuchen zu Grunde lag, ist folgender: Das Eiweiss des Protoplasmas ist, wenn nicht ausschliesslich, so doch zum grossen Theil mit phosphorhaltigen Complexen verbunden. Die Menge dieses mit Eiweiss verbundenen Phosphors ist besonders gross in dem als Kern differenzirten Theil der Zelle, der als ganz besonders wichtig für die Lebensthätigkeit gilt, also voraussichtlich vom hungernden Organismus am meisten geschont wird. Die Richtigkeit dieser Annahme ist durch das Experiment bestätigt. Nemser<sup>2)</sup> fand bei Mäusen, dass beim Hunger die Nucleine zwar eingeschmolzen werden, aber in geringerem Ausmaasse als die übrigen Bestandtheile der Zelle. Es fand also bei Hungerthieren ein relativer Zuwachs an Gesamt- und Nucleinphosphorsäure statt, der recht beträchtlich war. Wenn nun in der That ein rapides Absterben von relativ phosphorreichen Zellresten vor dem Hungertode eintritt, so besteht die Möglichkeit, dass das Verhältniss des ausgeschiedenen Stickstoffs zum ausgeschiedenen Phosphor sich mit dem Eintritt der «prämortalen Stickstoffsteigerung» zu Gunsten des Phosphors wesentlich verändern wird.

Da, soweit wir die Litteratur übersehen können, Hungerversuche mit gleichzeitiger Bestimmung des ausgeschiedenen Stickstoffs und Phosphor bis zum Eintritt der prämortalen Steigerung des Eiweissumsatzes nicht vorliegen, sahen wir uns zum Anstellen einiger derartiger Versuche veranlasst.<sup>3)</sup> Es

---

<sup>1)</sup> Peter Bergell, Fortschritte der Medicin, 1898, Bd. 16, S. 1—18.

<sup>2)</sup> G. M. Nemser, Maly's Jahresbericht, 1899, S. 661.

<sup>3)</sup> Der Hungerversuch von Bidder u. Schmidt an der Katze (Verdaunungssäfte und Stoffwechsel, 1852), sowie die Versuche von Falck an Hunden (Beiträge zur Physiol., Pharm. u. Hygiene, 1885) sind soweit uns bekannt die einzigen, in welchen die ausgeschiedene  $P_2O_5$  bis zum Hungertode bestimmt wurde. Auffallender Weise verliefen aber gerade diese Versuche (4 an der Zahl), ohne dass eine intensive prämortale Steigerung des Eiweissumsatzes stattfand, sind also für den vorliegenden Zweck nicht verwertbar.



am Hunde unternommen. Da nur grosse Differenzen im Verhältniss N:P als beweisend für unsere theoretischen Ueberlegungen hätten in Betracht kommen können, so wurde auf eine absolut genaue Abgrenzung der einzelnen Tagesportionen verzichtet; ebenso wurde von einer Analyse des Hungerkothes abgesehen, dessen Vertheilung auf die einzelnen Hungertage ausserdem nur mit Willkür möglich gewesen wäre. Die Thiere wurden in einen Stoffwechselkäfig gesetzt und jeden Mittag um 12 Uhr der in der untergesetzten Schale vorhandene Harn entnommen. Bei jeder Entnahme von Harn wurde der Käfig ausgespült und das Spülwasser mit dem Harn vereinigt. Die Kaninchen wurden bis zur Entleerung der Hauptmasse des von der vorgegangenen Nahrung herrührenden Kothes (3—4 Tage) durch einen dichten Drahtmaulkorb am Fressen ihres Kothes verhindert, um zu verhüten, dass nachträglich Nahrungsphosphor in die Circulation hereingerathe.

#### Versuch I.

Tag	Ausgeschiedener N	Ausgeschiedene $P_2O_5$	N : $P_2O_5$
1.	1,12	0,18	6,2
2.	1,15	0,25	4,6
3.	1,19	0,25	4,7
4.	1,54	0,31	5,0
5.	1,12	0,25	4,5
6.	1,17	0,25	4,7
7.	2,05	0,39	5,3
8.	2,00	0,33	6,0
9.	2,03	0,32	6,3
10.	2,70	0,42	6,4
11.	1,54	0,32	4,8

Das Thier starb einige Stunden vor Ablauf des 11. Versuchstages.

Der Stickstoff wurde in diesem und den nachfolgenden Versuchen nach Kjeldahl bestimmt, die  $P_2O_5$  mit Urannitrat titirt, unter Benutzung von Cochenille als Indicator.

Versuch II. Kaninchen (weiblich).

Versuchstag	Ausgeschiedener N	Ausgeschiedene $P_2O_5$	N : $P_2O_5$
1.	1,025	0,48	2,1
2.	0,907	0,19	4,8
3.	1,126	0,25	4,5
4.	1,126	0,25	4,5
5.	0,922	0,16	5,7
6.	0,953	0,18	5,3
7.	1,899	0,26	7,3
8.	1,969	0,34	5,2
9.	2,841	0,57	4,9
10.	1,703	0,23	7,4

Der 10. Versuchstag erstreckte sich nur über 12 Stunden.

Versuch III. Kaninchen (weiblich).

Versuchstag	Ausgeschiedener N	Ausgeschiedene $P_2O_5$	N : $P_2O_5$
1.	1,42	0,34	4,2
2.	1,42	0,34	4,2
3.	1,43	0,29	4,9
4.	1,43	0,29	4,9
5.	1,43	0,29	4,9
6.	1,20	0,21	5,7
7.	2,37	0,40	5,9
8.	2,37	0,40	5,9
9.	2,79	0,53	5,2
10.	2,94	0,55	5,3

Das Thier starb 1 Stunde vor Beendigung des 10. Versuchstages.

entwickeltem Panniculus adiposus. Das Thier starb einige Stunden nach Beendigung des 20. Tages.

Versuchstag	Ausgeschie- dener N in g	Ausgeschie- dene $P_2O_5$ in g	N : $P_2O_5$
1.	—	—	—
2.	—	—	—
3.	4,00	0,97	4,1
4.	—	—	—
5.	3,72	0,83	4,5
6.	—	—	—
7.	3,13	0,65	4,8
8.	3,76	0,85	4,4
9.	—	—	—
10.	5,14	1,10	4,7
11.	2,28	0,50	4,6
12.	2,93	0,52	5,6
13.	—	—	—
14.	5,99	0,95	6,3
15.	4,34	0,69	6,3
16.	3,62	0,56	6,5
17.	3,93	0,66	6,0
18.	5,13	0,82	6,3
19.	6,86	1,23	5,6
20.	7,14	1,18	6,0

Dieser Versuch verliert an Uebersichtlichkeit dadurch, dass die Harnentleerung namentlich in der ersten Zeit sehr unregelmässig war. Trotzdem geht aus den gefundenen Zahlen hervor, dass der Verlauf des Eiweissumsatzes etwas von dem gewöhnlichen Schema abweicht. Es ist keinesfalls in den ersten Tagen das übliche langsame Abfallen des Eiweissumsatzes unter der Nachwirkung der vorangegangenen Ernährung mit Eiweiss zu beobachten, sondern der Versuch setzt offenbar mit einem Minimum des Eiweissumsatzes ein. Wahrscheinlich hat das Versuchsthier vor dem Beginn des Versuches eine eiweissarme, fett- und kohlehydratreiche Kost bekommen. Ein besseres Bild lässt sich aus nachfolgender Tabelle gewinnen, in der Versuchstag 1—7, sowie 8—15 zusammengezogen sind.

Versuchs- tag	Ausgeschiedener N in g pro die	Ausgeschiedene $P_2O_5$ in g pro die	N : $P_2O_5$
1.—7.	1,55	0,35	4,7
8.—15.	3,05	0,58	5,3
16.	3,62	0,56	6,5
17.	3,93	0,66	6,0
18.	5,13	0,82	6,3
19.	6,86	1,23	5,6
20.	7,14	1,18	6,0

Vor der Besprechung der mitgetheilten Versuche sei ganz besonders hervorgehoben, dass bei allen 4 Versuchsthieren trotz der sehr ausgesprochenen prämortalen Steigerung des Eiweissumsatzes das makroskopisch sichtbare Fettgewebe durchaus nicht völlig verschwunden war. Namentlich der zu dem einen Versuche benutzte Hund hatte noch einen nicht unbeträchtlichen Panniculus adiposus. Unter diesen Umständen wurde auf eine quantitative Fettbestimmung in den Organen der Versuchsthier verzichtet. Aus diesen Beobachtungen erhellt aufs Neue, dass zur Zeit des Eintretens der prämortalen Stickstoffsteigerung von einem absoluten Fettmangel keine Rede sein kann, sondern höchstens von einem relativen.<sup>1)</sup>

Wenden wir uns nun zur genaueren Betrachtung der Versuchsreihen, speciell zu der Frage, inwieweit dieselben sich zur Stützung der Eingangs erwähnten Theorie verwerthen lassen.

Die im Harn zur Ausscheidung gelangende Phosphorsäure stammt einmal von den anorganischen Phosphaten (der Nahrung und der Knochen etc.), andererseits von organisch gebundenem Phosphor der verschiedenartigsten Körper (Lecithin, Nuclein etc.), verdankt also physiologisch durchaus verschiedenen Bestandtheilen des Organismus ihren Ursprung. Hierdurch wird die Verwerthung der für die ausgeschiedene  $P_2O_5$  gefundenen Zahlen ausserordentlich erschwert. Auch bei

<sup>1)</sup> Näheres s. bei Schulz. l. c.

stehen, da auch hier fortwährend anorganische Phosphate der Knochensubstanz in verhältnissmässig beträchtlichen Mengen zum Einschmelzen gelangen und die im Harn auszuschcheidende Phosphorsäure vermehren.<sup>1)</sup> Die physiologische Verschiedenartigkeit des organisch gebundenen Phosphors ist insofern leichter zu überwinden, da der eine Haupttheil des organisch gebundenen Phosphors, der im Nervensystem eine Rolle spielt, auch beim Hungerthier einen constanten Factor darstellen dürfte. Der andere Haupttheil des organisch gebundenen Phosphors ist in Form von nucleinartigen Substanzen auf die verschiedensten Organe in wechselnden Mengen vertheilt. Da das Zusammenwirken der Thätigkeit der einzelnen Organe bei völliger Nahrungsentziehung wesentlich alterirt ist, so muss auch das Verhältniss der Phosphorsäure zu den anderen Stoffwechselendprodukten dadurch verändert werden und auch in den einzelnen Abschnitten der Hungerperiode verschieden sein, ähnlich wie sich ja schon innerhalb 24 Stunden entsprechend den verschiedenen Tageszeiten Schwankungen in diesem Verhältnisse nachweisen lassen (s. Bergell l. c. S. 3). So zeigen denn auch unsere Versuchsreihen derartige Schwankungen im Quotient  $N : P_2O_5$ , auf deren Bedeutung gleich noch zurückgekommen werden soll. Die Unterschiede halten sich jedoch innerhalb auffallend enger Grenzen, sodass der Gedanke nahe gelegt wird, dass während der ganzen Hungerzeit die Zellbestandtheile der einzelnen Organe in annähernd gleichen wechselseitigen Mengenverhältnissen zur Einschmelzung gelangen. Der Theil der Versuche, auf den wir unser Augenmerk besonders richteten, die Zeit der prämortalen Steigerung des Eiweissumsatzes, verlief anders, als wir es nach den theoretischen Ueberlegungen erwartet hatten. Es trat keine wesentliche Aenderung in dem Verhältnisse  $N : P_2O_5$  ein. Es ist zwar in allen vier Versuchen während der Zeit der prämortalen Steigerung der Stickstoffausscheidung ein zeitweiliges rascheres Ansteigen der  $P_2O_5$ -Ausscheidung zur Beobachtung

---

1) s. Bergell's Referat, S. 6.

gelangt, sodass  $N : P_2O_5$  auf 4,8, 4,9, 5,2, 5,6 sinkt, aber die Differenzen sind doch viel zu geringfügig und vorübergehend, um daraus auf eine principielle Aenderung in der Art des zur Einschmelzung gelangenden Materials schliessen zu können. Ausserdem ist auch zu berücksichtigen, dass durch Vernachlässigung des ausgeschiedenen Hungerkothes eine wenn auch geringe Fehlerquelle gegeben ist, welche die beobachteten kleinen Differenzen erklären könnte.

Es erhebt sich nun die für uns wichtige Frage, ob durch den im gewissen Sinne negativen Ausfall unserer Versuche irgend eine Entscheidung über das Wesen der prämortalen Stickstoffsteigerung gefällt ist. Dies ist nach unserer Meinung nicht der Fall. Es haben unsere Versuche zunächst wieder eine willkommene Bestätigung der Thatsache gegeben, dass von einer absoluten Fettarmuth oder gar Fettfreiheit als Ursache der prämortalen Stickstoffsteigerung keine Rede sein kann. Es konnte sich also nur um eine relative Fettarmuth handeln in dem Sinne, wie sie der eine von uns früher<sup>1)</sup> erörtert hat, um eine Concurrenz zwischen dem allmählich versiegenden, aber immerhin noch vorhandenen Fett und dem noch in reicherer Masse zur Verfügung stehenden Organeiweiss. Diese für ganz extreme, für gewöhnlich wohl nur künstlich darstellbare Fälle bestehende Möglichkeit glauben wir jedoch für unsere Versuche ebenfalls mit Bestimmtheit ausschliessen zu können. Zunächst dürfte von einer Concurrenz zwischen Eiweiss und Fett doch nur dann die Rede sein, wenn das im Panniculus adiposus gewissermassen ausserhalb der Organisation stehende Fett verbraucht ist, was bei allen unseren Versuchsthiere nicht der Fall war.

Sodann handelt es sich um Thiere, die vor dem Beginn des Versuches mit einer Kost ernährt waren, die eiweissarm, dafür reich an stickstofffreien Nährstoffen war, bei denen also die Bedingungen für ein Ueberwiegen des Körpereiwisses gegenüber dem Reservefett möglichst ungünstig waren. Besonders lehrreich in dieser Hinsicht ist der Versuch am Hund.

---

<sup>1)</sup> Schulz, l. c., S. 384 u. 409.

gewählt worden. Der von der Regel abweichende Verlauf des Eiweissumsatzes zeigte ausserdem auf das Deutlichste an, dass gerade das Eiweiss gegenüber dem Fett geschont wurde.

Es bleibt also die Thatsache unbedingt bestehen, dass die gewöhnlich zur Erklärung der prämortalen Stickstoffsteigerung herangezogene Annahme nicht geeignet ist, diese Erscheinung in ihrem vollen Umfang zu erklären.

Was nun die von dem einen von uns früher aufgestellte Hypothese eines rapiden Absterbens von Zellen schon vor dem Tode des Gesamtorganismus anbelangt, so ist dieselbe durch die mitgetheilten Versuche zwar nicht wahrscheinlicher gemacht worden, aber auch keineswegs widerlegt. Wir hatten zwar vor Anstellen der Versuche einen anderen Verlauf erwartet; es konnte sich aber natürlich nur um Vermuthungen handeln, da unsere Kenntniss von der Rolle des Phosphors im thierischen Organismus noch in vielen wichtigen Punkten der Aufklärung bedarf. So viel steht jedoch fest (namentlich durch die Untersuchungen von Röhmann und seinen Schülern), dass die anorganischen Phosphate eine wesentlich andere Rolle spielen wie der organisch gebundene Phosphor. Dieser Letztere besitzt in hohem Maasse die Eigenschaft, vom Organismus zurückgehalten zu werden, während die anorganischen Phosphate anscheinend vom Thier nicht zum Aufbau organischer Phosphorverbindungen verwerthet werden. Da der bei einem eventuellen Absterben von Zellen freiwerdende Phosphor vorwiegend in organischer Bindung in die Circulation gelangen dürfte, wäre es sehr wohl möglich, dass derselbe von den überlebenden Zellen zum Ersatz verlorener Bestandtheile zurückbehalten würde.

Der negative Ausfall unserer Versuche beweist also nicht, dass nicht doch grössere Mengen von Phosphor, aus abgestorbenen Zellen stammend, in die Circulation gelangt sind, sondern nur, dass kein Ueberschuss von Phosphorsäure zur Ausscheidung gelangt ist.

An dieser Stelle möge hervorgehoben werden, dass wir wohl erwogen haben, ob nicht unter diesen abnormen Verhältnissen auch abnorme grosse Mengen von Phosphor in

organischer Bindung in den Harn gelangten und dann dort eventuell der Titration mit Uran entgingen. Um dies festzustellen, wurden einige der Harne, welche der Zeit der prämortellen Steigerung entstammen, auf organisch gebundenen Phosphor untersucht.

Zunächst wurden Harne einmal direkt und ein zweites Mal nach vorherigem Kochen mit stärkerer Salzsäure titriert. Die Titration ergab keine nachweisbaren Unterschiede. (Natürlich wurde der angesäuerte Harn vor der Titration neutralisirt.) Sodann wurden andere Harne analog dem von Oertel<sup>1)</sup> zur quantitativen Bestimmung angewandten Verfahren qualitativ auf organisch gebundenen Phosphor untersucht, mit dem Ergebniss, dass die nachweisbare Menge so gering war, dass wir ein Recht hatten, sie bei unseren Versuchen zu vernachlässigen.

Wir halten unser Versuchsmaterial nicht für ausreichend, um in die Discussion über den « Phosphor-Stoffwechsel » im Allgemeinen einzugreifen, so verlockend dies bei der Fülle von Problemen, die sich auf diesem Gebiete entgegenstellen, erscheinen möchte.

---

<sup>1)</sup> Oertel, Zeitschr. f. physiol. Chemie, 1898, Bd. XXVI, S. 125.

---



# Die Oxydationsprodukte des Arginins

Von

Dr. Elophe Bénech und Fr. Kutscher.

## I. Mittheilung.

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 11. Februar 1901.)

Im Beginn des Sommersemesters 1899 war von Herrn Professor Kossel dem Herrn Dr. Bénech die Aufgabe gestellt worden, zu untersuchen, ob sich bei der Oxydation der Gelatine Hexonbasen bilden oder nicht. Das Resultat dieser Untersuchungen ist von Bénech in der *Revue générale des Sciences* (Jahrg. 11, S. 788—798) mitgetheilt worden. Dasselbe steht im Gegensatz zu den Angaben, die Bernert vorher über die Oxydationsprodukte des Eialbumins gemacht hatte. Nach den Angaben Bernert's<sup>1)</sup> sollte das Eialbumin bei der Oxydation durch Kaliumpermanganat die drei Hexonbasen Histidin, Arginin, Lysin liefern. Bénech dagegen konnte bei seinen zahlreichen Oxydationsversuchen der Gelatine nicht einmal das Arginin, das uns in Folge der ausgezeichneten von Kossel angegebenen Isolirungsmethode leicht zugänglich geworden ist, unter den Oxydationsprodukten der Gelatine nachweisen.

Daraufhin begann Bénech, auf Veranlassung von Herrn Professor Kossel, das Verhalten der einzelnen rein dargestellten Hexonbasen, namentlich aber des Arginins gegen Oxydationsmittel zu prüfen. Diese Arbeit musste Herr Bénech vor ihrer Beendigung abbrechen. Auf meine Bitte überliess Herr Professor Kossel es mir, die Versuche von Bénech, so weit sich dieselben auf die Oxydation des Arginins bezogen, abzuschliessen.

---

1) Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 272.

Aus den von Bénech gemachten Vorarbeiten wusste ich, dass das Arginin durch die verschiedensten Oxydationsmittel sehr leicht angegriffen wird. Auch vermuthete Bénech bereits, dass das Arginin bei der Oxydation Guanidin und eine Amidosäure liefern könnte. Doch vermochte ich wohl charakterisirte krystallinische Oxydationsprodukte des Arginins nicht zu gewinnen. Erst als ich als Oxydationsmittel Baryumpermanganat brauchte, das Herrn Dr. Steudel<sup>1)</sup> bei der Oxydation des Thymins gute Dienste geleistet hatte, erhielt ich befriedigende Resultate.

Meine Versuchsanordnung bei der Oxydation des Arginins durch Baryumpermanganat war folgende:

4,0 g kohlen-saures Arginin wurden in 100 ccm. Wasser gelöst, auf 30° C. erwärmt und nun mit 8,0 g Baryumpermanganat, die in 200 ccm. Wasser gelöst waren, versetzt. Darauf wurde das Ganze zwei Stunden im Brutschrank bei 30° C. gehalten und schliesslich im Wasserbade auf 60° C. erwärmt. Dabei trat schnell Entfärbung der Flüssigkeit ein. Während der Oxydation entwickelte sich reichlich Ammoniak. Nach eingetretener Entfärbung wurde sofort vom Manganschlamm abfiltrirt. In das Filtrat wurde Kohlensäure eingeleitet und danach die Flüssigkeit auf ein kleines Volumen (ca. 50 ccm.) eingeengt. Es schied sich dabei etwas Baryumcarbonat ab. Dasselbe wurde durch Filtration entfernt. Das neue schwach alkalisch reagirende Filtrat wurde mit einer gesättigten Lösung von Natriumpikrat versetzt. Sofort fiel ein schwerlösliches Pikrat aus, das nach 24 Stunden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus siedendem Wasser umkrystallisirt wurde. Ich erhielt so 1,7 g einer wohl krystallisirten Verbindung. Eine Stickstoffbestimmung erwies dieselbe als Guanidinpikrat.

Es gaben bei der Verbrennung 0,1316 g Substanz bei 12° C. und 750 mm. Ba 33,2 ccm. Stickstoff.

Für  $\text{CH}_5\text{N}_4 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_7$

Berechnet  
N = 29,2%

Gefunden  
N = 29,7%

---

<sup>1)</sup> Aus den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften zu Marburg Nr. 2 Januar 1901. Diese Zeitschrift Bd. XXXII, S. 241.

Goldverbindung übergeleitet und ebendort analysiert.

0,1148 g Goldsalz gaben 0,0565 g Au.

Für  $\text{CH}_2\text{N}_3\text{HCl} \cdot \text{AuCl}_4$

Berechnet  
Au = 49,4%

Gefunden  
Au = 49,2%

Durch das Auffinden des Guanidins unter den Oxydationsprodukten des Arginins wird die auch durch die Synthese gestützte Annahme von E. Schulze und Winterstein, nach der das Arginin ein Derivat des Guanidins ist, vollkommen bestätigt. Da wir weiter über die zweite Componente des Arginins nach den Arbeiten von E. Schulze<sup>2)</sup> und Ellinger<sup>3)</sup> nicht in Zweifel sein können, dieselbe muss  $\alpha$ -Amido-Normal-valeriansäure sein, so dürfen wir das Arginin analog dem Kreatin als Guanidin- $\alpha$ -Amidovaleriansäure bezeichnen.

Die vorstehenden Beobachtungen scheinen mir noch in anderer Hinsicht von Interesse zu sein. Bekanntlich ist von Lossen<sup>4)</sup> bei milder Oxydation des Eiweisses mit Kaliumpermanganat als ständiges Oxydationsprodukt Guanidin erhalten worden. Nachdem wir gezeigt haben, dass das Arginin bei einem Oxydationsverfahren, welches dem von Lossen<sup>4)</sup> angewandten sehr ähnlich ist, reichlich Guanidin zu liefern vermag, kann über die Atomgruppe des Eiweisses, aus der bei der Oxydation das Guanidin hervorgeht, kaum ein Zweifel bestehen. Es muss dieselbe sein, die bei der hydrolytischen Spaltung des Eiweisses Arginin liefert, also der Hexonkern Kossel's.<sup>5)</sup>

---

1) Diese Zeitschrift Bd. XXVI, S. 1.

2) Berichte der deutschen chem. Gesellsch. 32, S. 3191.

3) Diese Zeitschrift Bd. XXIX, S. 334 u. Berichte der deutschen chem. Gesellsch. 31, S. 3183.

4) Annalen der Chemie u. Pharmacie Bd. 201, S. 369.

5) Aus den Sitzungsber. d. Gesellschaft zur Beförd. d. ges. Naturw. zu Marburg. Sitzung vom 6. April u. Diese Zeitschrift Bd. XXXI, S. 175.

## Ueber das Ichthulin des Kabeljau.

Von

P. A. Levene.

---

(Aus der physiologisch-chemischen Abtheilung des pathologischen Instituts der  
New-Yorker Staatshospitäler.)

(Der Redaction zugegangen am 12. Februar 1901.)

---

Die Untersuchungen über die chemischen Bestandtheile des Spermas verschiedener Fische, die im Laboratorium von Prof. A. Kossel während der letzten Jahre gemacht wurden, haben die Thatsache ergeben, dass dasselbe Organ bei verschiedenen Thieren eine verschiedene chemische Zusammensetzung haben kann. Die Unterschiede, die an den Protaminen verschiedener Fische gefunden wurden, haben viel dazu beigetragen, unsere jetzigen Kenntnisse über die Zusammensetzung des Proteidmoleküls zu fördern.

Der Hauptbestandtheil des Eidotters ist die Paranucleo-Verbindung, die mit Recht als die Muttersubstanz aller Nucleo-Verbindungen des entwickelten Organismus betrachtet werden kann. Man schien zur Annahme berechtigt, dass das Studium der Paranucleo-Verbindungen der verschiedenen Fische uns dazu verhelfen wird, die chemische Natur dieser Verbindungen zu ergründen.

Die einzige Substanz, der ein gründliches Studium zu Theil wurde, ist das von Walter<sup>1)</sup> untersuchte Ichthulin des Karpfeneies.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XV, S. 477.

ich eine ziemlich Quantität von Kabegaleien zur Verfügung, die mir die Gelegenheit gab, folgende Studien zu machen:

Der Fischrogen war gut mit Sand zu einem dicken Brei zerrieben und durch eine Handpresse gepresst. Die Eier mit dem Sande wurden in grosse mit 5%iger Chlorammoniumlösung gefüllte Flaschen übertragen. Sie wurden zunächst mit dieser Flüssigkeit allein, später unter Zusatz ziemlich grosser Quantitäten Aether geschüttelt, dann über Nacht stehen gelassen. Alsdann wurde die Lösung abgehebert, filtrirt und mit wenigstens 20 Volumina Wasser verdünnt.

Der dabei entstehende Niederschlag wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, nochmals mit 5%iger Lösung von Chlorammonium aufgenommen und in einem Scheidetrichter mit Aether geschüttelt. Die Lösung wurde wieder mit 20 Volumina Wasser niedergeschlagen und mehrmals gewaschen. Dieses Verfahren wurde so lange wiederholt, bis das Waschwasser keine Spur von Biuretreaction zeigte. Der Niederschlag wurde alsdann mit heissem und kaltem Alkohol extrahirt.

Der Niederschlag, der ursprünglich vollständig weiss war, wurde durch die Behandlung mit heissem Alkohol orangegeb.

Er wurde zuletzt mit absolutem Alkohol und Aether extrahirt.

Diese Substanz kann auch durch Kohlen- oder Essigsäure niedergeschlagen werden. In letzterem Falle muss die Säure sehr vorsichtig zugefügt werden.

1 ccm. 1%ige Essigsäure zu 100 ccm. der Lösung genügt zur Ausfällung. Zur Wiederauflösung des Niederschlags dürfen nur ganz verdünnte Lösungen von Alkalien benutzt werden.

Die Analyse eines Präparates, das durch die erste Methode gewonnen wurde, ergab die folgende Zusammensetzung:

1. 0,3156 g der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,602 g  $\text{CO}_2$ ; C = 52,31 und 0,2118  $\text{H}_2\text{O}$ ; H = 7,42%.

2. 0,2145 g der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,4137 g  $\text{CO}_2$ ; C = 52,57% und 0,1463  $\text{H}_2\text{O}$ ; H = 7,48%.

3. 0,4795 g der Substanz, nach Kjeldahl behandelt, ergaben N = 15,96%.

4. 0,2482 g der Substanz wurden mit Natronhydrat und Kaliumnitrat geschmolzen,  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,0058; P = 0,65%.

5. 0,2996 g der Substanz, mit Natronhydrat und Kaliumnitrat geschmolzen, ergaben 0,0201 BaSO<sub>4</sub>; S = 0,92 %.

In der folgenden Tabelle sind die Ichthuline verschiedener Forscher verglichen:

	C	H	N	S	P	Fe	O
Fremy	52,5—53,3	8,82	15,2	1,00	0,6	22,7	
Gobley	52,6	7,74	15,5	0,90	0,37	23,24	
Walter	53,52	7,6	15,63	0,41	0,43	0,10	22,19
Levene	52,44	7,45	15,96	0,92	0,65	22,58.	

In dieser Weise finden wir nur einen geringen Unterschied zwischen der Zusammensetzung des Ichthulins beim Kabeljau und dem von Walter untersuchten.

Es war von Interesse auch die anderen Eigenschaften dieses Ichthulins mit denen des Karpfenichthulins zu vergleichen.

Das Paranucleoproteid von Walter unterscheidet sich von jedem anderen durch zwei Eigenschaften:

1. Es bildet bei hydrolytischer Spaltung eine reducirende Substanz, 2. es bildet bei der Behandlung mit Alkalien keine Paranucleosäure, obgleich es durch Pepsinsalzsäure zu einem Nuclein verdaut wird. Um das Kohlenhydrat zu gewinnen, wurden Walter's Vorschriften genau befolgt, doch konnte ich keine reducirende Substanz erlangen. Das Experiment wurde 2 Mal wiederholt, einmal mit 5 g und das andere Mal mit 3 g der reinen Substanz. Hier also ist ein Unterschied zwischen dem Ichthulin des Kabeljau und dem des Karpfens.

Es wurde dann versucht, Paranucleinsäure daraus zu gewinnen. Dieselbe Methode, die ich für Nucleinsäure angewandt hatte, ermöglichte eine Substanz zu gewinnen, die in ihren Eigenschaften der Vitellinsäure ähnlich ist. Das Ichthulin wurde in 80%igem Ammoniakwasser aufgelöst und genau in derselben Weise behandelt, wie das Vitellin zum selben Zwecke. Die dabei gewonnene Substanz hatte folgende Zusammensetzung:

#### C- und H-Bestimmung.

1) 0,2080 g der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,2483 g CO<sub>2</sub>, C = 32,55 und 0,1114 H<sub>2</sub>O; H = 5,95.

2) 0,1782 g der Substanz ergaben bei der Verbrennung 0,2128 g CO<sub>2</sub>; C = 32,57 und 0,097 H<sub>2</sub>O; H = 6,05.

0,3196 g der Substanz mit Natronhydrat und Kaliumnitrat geschmolzen ergaben 0,1189 g  $Mg_3P_2O_7$ ; P = 10,39%.

0,500 g der Substanz mit Natronhydrat und Kaliumnitrat geschmolzen ergaben 0,0053  $BaSO_4$ ; S = 0,146%; und 0,1843  $Mg_3P_2O_7$ ; P = 10,29%.

In der folgenden Tabelle sind die Analysen der Vitellinsäure und Ichthulinsäure verglichen.

	Vitellinsäure <sup>1)</sup>	Ichthulinsäure
C	32,31	32,56
H	5,58	6,00
N	13,13	14,03
S	0,3266	0,146
P	9,88	10,34

Dieser Analyse nach ist der Unterschied zwischen den beiden Säuren nicht bedeutend, und ist wahrscheinlich dem Proteidtheil des Moleküles zuzuschreiben.

In allen ihren Eigenschaften ist diese Substanz derjenigen der Vitellinsäure ähnlich. Sie gibt dieselbe Farbenreaction. Die Wirkung des Alkohols auf die Lösung der Natriumsalze ist auch dieselbe, und sie verhält sich auch gegenüber dem Verfahren von Schmiedeberg ebenso wie die Vitellinsäure.

Das Ichthulin des Kabeljau unterscheidet sich also von dem des Karpfens dadurch, dass es bei der Hydrolyse kein Kohlenhydrat erzeugt und bei der Behandlung mit Alkalien eine Substanz abgibt, die derjenigen der Vitellinsäure ähnlich ist. Dieses Ichthulin ist daher mehr dem Vitellin, als dem von Walter beschriebenen Ichthulin ähnlich.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 549.

# Das Verhalten einiger Pyrimidinderivate im Organismus.

Von  
H. Steudel.

---

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg a. L.)  
(Der Redaction zugegangen am 1. März 1901.)

---

Die Frage nach der Herkunft der Harnsäure im thierischen Organismus hat schon seit langen Zeiten das Interesse der Physiologen und Kliniker lebhaft beschäftigt, und zahlreich sind die Versuche, in denen eine Lösung dieser für den thierischen Haushalt grundlegenden Frage angestrebt wurde. Aber erst, nachdem durch die Arbeiten Kossel's die Nucleinsäuren als Muttersubstanzen der Alloxurkörper erkannt waren, während man früher die Purinkörper noch zu den Bestandtheilen des Eiweisses rechnete, wurde die Forschung nach der Entstehung der Harnsäure in sichere Bahnen gelenkt. Naturgemäss richtete sich das Hauptaugenmerk aller Beobachter zunächst auf das Verhalten der bis jetzt bekannten Bestandtheile der Nucleinsäuren, während der noch unbekannte Rest nur nebenher Beachtung fand, und die Alloxurkörper wurden demgemäss in mehr oder minder hohem Grade für die Bildung der Harnsäure theils direkt, theils indirekt verantwortlich gemacht. Nachdem nun aber unter den Spaltungsprodukten der Nucleinsäuren auch Substanzen aus der Pyrimidinreihe<sup>1)</sup> aufgefunden worden waren, musste man doch daran denken, ob nicht auch der animalische Organismus die Fähigkeit habe, aus diesen einfacheren Verbindungen Alloxurkörper aufzubauen und so durch Anlagerung eines Harnstoffrestes an den Pyrimidinkern Purinderivate zu liefern. Der Gedanke schien umsomehr erwägungswerth, als bekanntlich die erste wirklich rationelle Synthese der Harnsäure von Behrend und Roosen<sup>2)</sup> experimentell über Derivate aus der Pyrimidinreihe hin ausgeführt ist und derselbe Weg

---

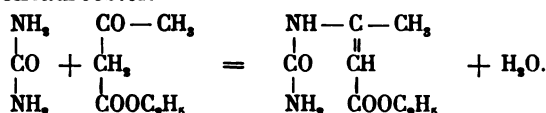
1) Diese Zeitschrift, Bd. 32, S. 244.

2) Liebig's Annalen, Bd. CCLI, S. 235.

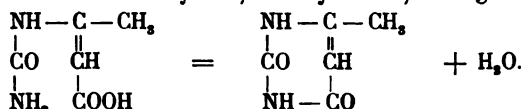


Darstellung anderer Alloxurkörper als gangbar erwiesen hat.  
 Die Synthese der Harnsäure nach Behrend und Roosen<sup>1)</sup> verläuft, kurz zusammengefasst, in folgender Weise:

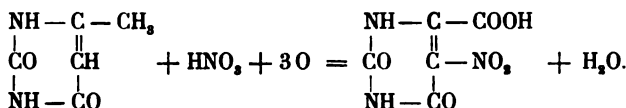
Harnstoff und Acetessigester condensiren sich zu  $\beta$ -Uramidocrotonsäureester.



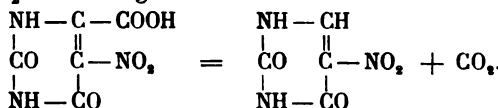
Dieser Ester, mit KOH verseift, gibt das Kaliumsalz der entsprechenden Säure, die im freien Zustande aber gleich  $\text{H}_2\text{O}$  abspaltet und in ihr Anhydrid, Methyluracil, übergeht.



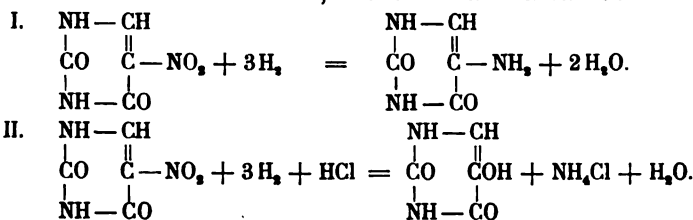
Das Methyluracil wird durch rauchende Salpetersäure in Nitrouracilcarbonsäure verwandelt:



Die Nitrouracilcarbonsäure spaltet beim Erhitzen ein Molekül  $\text{CO}_2$  ab und geht in Nitrouracil über:



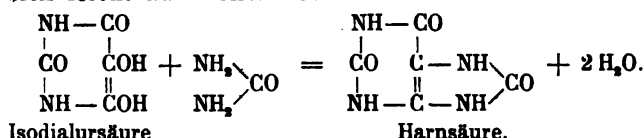
Das Nitrouracil liefert bei der Reduction mit Zinn und Salzsäure theils Amidouracil, theils Isobarbitursäure:



<sup>1)</sup> Ber. d. deutsch. chem. Ges., 1900, Bd. XXXIII, S. 1371.

<sup>2)</sup> loc. cit.

Itursäure die Isodialursäure, die das Verbindungsglied der Pyrimidin- mit der Purinreihe darstellt, denn, mit Harnstoff bei Gegenwart von concentrirter Schwefelsäure erwärmt, condensirt sie sich leicht zu Harnsäure:



Ich habe nun das Verhalten dieser sämtlichen Körper im Organismus geprüft; als Versuchsthier wählte ich einen Hund (weibl. Foxterrier von 6200 g Gewicht), dem die Substanzen in Dosen von täglich 1 g Morgens, in Hackfleisch gewickelt, per os verabreicht wurden. Der mit dem Katheter zweimal täglich entnommene Harn wurde dann eingeeengt und auf in Wasser schwerlösliche Körper, eventuell nach Extraction des Harnstoffs mit Alkohol, gefahndet. Bei negativem Ausfall wurde eine Fällung mit ammoniakalischer Silberlösung, resp. Silbernitrat und Baryt, mit der sämtliche oben aufgeführten Körper, sowie etwaiges Allantoin u. s. w., schwerlösliche Verbindungen geben, zu erhalten versucht, die dann in der Wärme mit  $\text{H}_2\text{S}$  zersetzt, heiss filtrirt und zur Krystallisation eingeeengt wurde.

Dabei wurde nun gefunden, dass das Methyluracil reichlich aus dem Harn wieder erhalten werden konnte. Es krystallisirte schon spontan bei ruhigem Stehen aus und lieferte nach einmaligem Umkrystallisiren den theoretisch verlangten Stickstoffwerth.

0,1676 g gaben 32,0 ccm. N bei  $t = 12^\circ$  und  $p = 74,4$  cm.

Berechnet für  $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4$ :

22,28 %

Gefunden:

22,35 %

Um mich zu überzeugen, ob nicht etwa sich ein Isomeres gebildet hatte, habe ich 1 g der Oxydation mit Kaliumpermanganat unterworfen und den für das Methyluracil als Spaltungsprodukt charakteristischen, bei  $215^\circ$  schmelzenden Acetylharnstoff erhalten.

Die verfütterte Nitrouracilcarbonsäure konnte ich

löslichen Körper finden, es gelang mir weder, sie als schwerlösliches Kaliumsalz, noch als Silberverbindung zu erhalten, so dass dieser Körper also wohl eine vollkommene Spaltung im Organismus erfahren hat.

Nitrouracil liess sich wiederum leicht unverändert aus dem Harn zurückgewinnen; mit ammoniakalischer Silberlösung umgefällt und mit HCl wieder in Freiheit gesetzt, gab es bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung den verlangten Werth.

0,1432 g lieferten 32,8 ccm. N bei  $t = 10^{\circ}$  und  $p = 74,2$  cm.

Berechnet für  $C_4H_3N_3O_4$ :

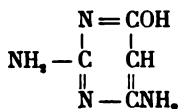
26,80 %

Gefunden:

26,88 %.

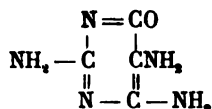
Nach der Verfütterung von Isobarbitursäure und Iso-dialursäure endlich tritt ebenfalls kein schwerlösliches Condensationsprodukt im Harn auf, da ich auch hier mit ammoniakalischem Silber nicht irgendwie nennenswerthe Niederschläge erhalten habe, ein Resultat, das das gleiche war, als ich dem Hunde Thymin und ferner das 2,6 Dioxypyrimidin aus Hefenucleinsäure verabreicht hatte. Es erschienen aber auch nicht die verfütterten Körper im Harn wieder. Eine Synthese war also bei keiner der Substanzen eingetreten; besonders auffallend ist, dass im Gegensatz zum Thymin (5 Methyl- 2,6 dioxypyrimidin) das nur in der Stellung der Methylgruppe von ihm verschiedene Methyluracil (4 Methyl- 2,6 dioxypyrimidin) den spaltenden Kräften des Organismus Widerstand leistet. Ebenso wird das Nitrouracil (5 Nitro- 2,6 dioxypyrimidin) vom Thierkörper nicht angegriffen, so dass also die Nitrogruppe in derselben Stellung wie die Methylgruppe den Pyrimidinring vor einer Spaltung mit Erfolg zu schützen vermag.

Um die Reihe der zur Beobachtung herangezogenen Pyrimidinderivate noch etwas zu vergrössern, habe ich dann ferner das nach der von Traube<sup>1)</sup> angegebenen Methode dargestellte 2,4-Diamino 6-oxypyrimidin



<sup>1)</sup> loc. cit.

und das 2,4,5-Triamino 6-oxypyrimidin



auf ihr Verhalten im Thierkörper geprüft. Beide, in Form ihres Sulfats dem Hunde in gewohnter Weise zu je 1 g verabreicht, erwiesen sich, während alle anderen Körper keine Störungen hervorgerufen hatten, als toxisch; nach dem Genuss des Diaminooxypyrimidinsulfats trat Erbrechen auf, so dass ich von einer weiteren Verfütterung Abstand nahm, und das Triaminooxypyrimidin rief ebenfalls erhebliche Störungen im Allgemeinbefinden des Versuchstieres hervor. Der Hund hatte etwa eine Stunde nach Verabreichung der Substanz starken Brechreiz, ohne jedoch etwas von sich zu geben, er winselte und heulte, hatte keine Fresslust und lag fast den ganzen Tag in seinem Käfig interesselos auf der Seite, während er sonst recht munter war und gerne spielte, sobald man sich mit ihm beschäftigte. Der Harn enthielt etwas Eiweiss, hyaline Cylinder und unverändertes Triaminooxypyrimidin, das leicht in Form seines Sulfates wieder gewonnen und durch die charakteristische Dunkelviolettfärbung der freien Base an der Luft identificirt werden konnte, wenn man das Sulfat mit  $\text{NH}_3$  übersättigte. Um mich über die Giftigkeit der Substanzen etwas näher zu orientiren, habe ich die Ratten subcutan eingespritzt und gefunden, dass bei ihnen das Diaminooxypyrimidinsulfat in einer Dosis von 0,2 g, das Triaminooxypyrimidinsulfat in einer Gabe von 0,1 g letal wirkt. Während nun aber die Section der mit Diaminooxypyrimidin vergifteten Ratten nichts Charakteristisches ergab, zeigten sich in den Nieren der mit Triaminooxypyrimidin getödteten Thiere zahlreiche Concremente, die unter dem Mikroskop in täuschender Weise die Bilder lieferten, wie sie Minkowski<sup>1)</sup> an den Nieren von mit Adenin vergifteten Hunden beschrieben hat. Die Natur der Ablagerungen konnte in unserem Falle leicht festgestellt werden. Durch Behandeln der Schnitte mit verdünntem Am-

<sup>1)</sup> Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. XLI, S. 375.

übergehende röthliche Färbung derselben zu erzielen; es hatte sich also in den Harnkanälchen ein schwerlösliches Salz der unveränderten Base niedergeschlagen. In den Glomerulis konnte ich ebensowenig wie Minkowski Concremente entdecken.

Die Anlagerung von Amidogruppen an den Pyrimidinkern hatte also genügt, um aus indifferenten Körpern für den thierischen Organismus giftige Substanzen zu liefern, ein Befund, der wohl geeignet ist, auch die giftigen Eigenschaften des Adenins, das ja 6-Aminopurin ist, zu erklären. Durch Prüfung anderer Amidoderivate der Pyrimidin- und Purinreihe wird man leicht die allgemeine Gültigkeit der Hypothese beweisen können.

Der Erwartung, eine Synthese zu einem Purinkörper einzugehen, hat also keiner der im Vorstehenden aufgeführten Körper entsprochen, trotzdem wird man nicht aus den Versuchen den Schluss ziehen dürfen, dass eine solche überhaupt im Thierkörper nun nicht stattfinden könnte. Erstens ist ja der Hund zum Studium der Harnsäurebildung nicht das günstigste Versuchsthier, und ich hatte ihn nur gewählt, weil seine Wartung und Fütterung eine leichte und das Auffangen des Harns ohne Schwierigkeit quantitativ möglich war; zweitens haben Fütterungsversuche, wie die obigen, in denen per os grosse Mengen von theils körperfremden Substanzen und theils solchen eingeführt werden, die sonst nur sehr allmählich im Laufe des Stoffwechsels der Zellen an ganz anderen Orten entstehen, nur einen sehr relativen Werth, wie schon Kossel<sup>1)</sup> hervorgehoben hat, und eine Uebertragung der erhaltenen Resultate auf die physiologischen und thatsächlichen Verhältnisse ist nur mit grossen Einschränkungen gestattet. Wie sich die Resultate beim Menschen gestalten werden, dem man auf Grund der Ergebnisse der Thierversuche wohl Methyluracil, Thymin u. s. w. mit Ausnahme der Amidoderivate wird geben dürfen, müssen weitere Versuche lehren.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. 8, S. 409.

# Beiträge zur Kenntniss des Magensaftes und der chemischen Zusammensetzung der Enzyme.

Von

M. Nencki und N. Sieber.

---

(Aus der chemischen Abtheilung des Instituts für experimentelle Medicin zu Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 1. März 1901.)

---

Man kann sagen, dass erst seit der Arbeit von Professor J. Pawlow und Frau Dr. Schoumow-Simanowski,<sup>1)</sup> welche zeigten, dass von gastro- und ösophagotomirten Hunden bei der Scheinfütterung reflectorisch reiner Magensaft in grossen Mengen abgesondert wird, ein wirklich reiner, von allen fremden Beimischungen freier Saft in beliebig grossen Quantitäten erhalten werden kann. Kurz nach der Veröffentlichung der Arbeit von Pawlow und Schoumow-Simanowski hat die Letztere den so gewonnenen Saft in unserem Laboratorium einer chemischen Analyse unterworfen.<sup>2)</sup> Sie benutzte dabei die Beobachtung, dass solcher Magensaft, auf 0° abgekühlt, einen amorphen, körnigen Niederschlag bildet, um das wirksame Princip durch einfache Filtration bei niedriger Temperatur aus dem Magensaft zu isoliren. Ausser den verschiedenen Analysen des frischen Saftes hat Frau Schoumow-Simanowski auch diesen körnigen Niederschlag, der Eiweissstoffe energisch verdaut, und den sie auf Grund ihrer Untersuchung als das wirksame Enzym resp. Gemisch der Enzyme des Magensaftes angesehen hat, analysirt und gefunden, dass dieser Niederschlag aus einem eigenthümlichen chlorhaltigen Eiweisskörper besteht. In der Asche desselben hat sie neben

---

<sup>1)</sup> Wratsch, 1890, Nr. 41.

<sup>2)</sup> Archiv f. exper. Pathologie und Pharmacologie, Bd. 33, S. 336.

nannte körnige Pepsin gehört, hat sie nicht näher bestimmt und wurde leider durch Krankheit an der Fortsetzung ihrer Untersuchung verhindert. Obgleich wir, durch die Publication von Pekelharing<sup>1)</sup> und Hammarsten<sup>2)</sup> angeregt, uns wiederholt vorgenommen haben, die Untersuchung über die Enzyme des Magensaftes wieder aufzunehmen und uns reiner Magensaft leicht zugänglich war, konnten wir, durch andere Arbeiten in Anspruch genommen, erst im Herbst des Jahres 1899 an die Ausführung unseres Vorhabens herantreten.

Bevor wir zur Beschreibung unserer eigenen Versuche und deren Resultate übergehen, halten wir es für zweckmässig, des leichteren Verständnisses wegen, die Ergebnisse der Pekelharing'schen Arbeit kurz zu recapituliren.

Pekelharing extrahirte Fundusmucosa von Schweinemägen mit 0,2%iger HCl, filtrirte unter vermindertem Druck und dialysirte das Filtrat im Pergamentschlauch gegen strömendes Leitungswasser 15—20 Stunden lang. Dadurch sank der Säuregrad des Schlauchinhalts auf etwa 0,02%, die Flüssigkeit wurde trübe von suspendirtem Niederschlag, der mittelst Centrifuge getrennt und, wiederum in 0,2%iger HCl gelöst, sich als ein äusserst wirksames Pepsin erwies. Durch wiederholtes Auflösen in 0,2%iger HCl und bei 15 bis 20 stündiger Dialysiren der Lösung, wobei er sich von Neuem ausscheidet, wurde der Körper gereinigt. Der nach dem Centrifugiren erhaltene Niederschlag, mit wenig destillirtem Wasser gewaschen und anfangs auf Fliesspapier, sodann über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  getrocknet, bildet ein gelbes, leicht zerreibliches, kaum hygroskopisches Pulver, das wenig in Wasser, leichter in verdünnter Kochsalzlösung, namentlich bei Brüttemperatur, löslich ist. In verschiedenen verdünnten Säuren löst es sich, am besten bei Körpertemperatur, zu einer wasserklaren Flüssigkeit auf und scheidet sich flockig aus, sobald der Säuregrad bis zu einem gewissen Gehalte

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 233.

2) Dessen Lehrbuch der physiol. Chem., S. 264, 4. Auflage, 1899.

erniedrigt ist. Für Salzsäure ist die Löslichkeit am geringsten bei etwa 0,02%. Nach Pekelharing enthält diese Substanz, die alle Reactionen der Eiweisskörper zeigt und als ausserordentlich kräftiges Pepsin sich herausstellte, ungefähr 1,0% Phosphor. Diese sehr complicirt zusammengesetzte Verbindung ist sehr labil. Das Auswaschen durch Alkohol zerstört sie; sie verliert dabei ihre Löslichkeit in HCl und auch das Vermögen, Eiweiss zu verdauen. Wird ihre wässerige, saure Lösung schnell zum Kochen erhitzt, so wird sie gespalten: 1. in ein bei saurer Reaction unlösliches Nucleoproteid; 2. in eine Albumose und 3. in eine im warmen Alkohol leicht, in kaltem schwer lösliche, phosphorhaltige Substanz.

Pekelharing vermuthet, dass das von ihm auf die oben beschriebene Weise erhaltene Pepsin identisch sei mit dem von Frau Schoumow-Simanowski durch Abkühlen des natürlichen Magensaftes isolirten körnigen Pepsin, gibt aber nicht an, ob sein Produkt chlorhaltig sei. Nach den Analysen von Schoumow-Simanowski enthält das körnige Pepsin etwa 1% Chlor. In einer im vorigen Jahre erschienenen Mittheilung von Friedenthal,<sup>1)</sup> der den nach Pawlow's Methode erhaltenen Magensaft untersuchte, wird der Chlorgehalt des Pepsins geleugnet. Nach ihm ist die Salzsäure im Magensaft nur als freie Salzsäure enthalten. Der Gefrierpunkt des von ihm untersuchten Saftes, dessen Säuregehalt = 0,577% HCl war, lag bei  $-0,61^{\circ}$ , also fast genau übereinstimmend mit dem einer 0,577%igen HCl. Aus dieser Thatsache, sagt Friedenthal, kann mit Sicherheit gefolgert werden, dass die Salzsäure nicht in einer chemischen Verbindung mit Pepsin im Magensaft enthalten ist. Vorgreifend wollen wir schon hier bemerken, dass nach unserer Meinung die Ansicht Friedenthal's eine irrige ist. Zweifellos ist das Molekulargewicht des Pepsins ein sehr hohes und je höher das Molekulargewicht, um so kleiner ist die durch die betreffende Substanz bewirkte Depression. Im Vergleich zu der starken Depression, welche durch die freie Salzsäure des

---

1) Archiv f. Anat. u. Physiol., Jahrg. 1900, physiol. Abth., 186.



bedingte eine verschwindend kleine. Der Magensaft des Hundes enthält ca. 0,3 % festen Rückstand. Angenommen, dass der feste Rückstand nur aus Pepsin besteht, so sind dafür, unter der Voraussetzung, dass das Pepsin 1,0% HCl enthält, 0,003 g HCl erforderlich. Der von Friedenthal untersuchte Saft enthielt im Liter 5,77 g HCl. Von diesen 5,77 g wären danach nur 0,03 g HCl oder etwa der 0,005te Theil an Pepsin gebunden, die übrige Säure des Saftes aber als freie Säure darin vorhanden. Dass die Gefrierpunktbestimmung über die Frage, ob das Pepsin des Magensaftes Chlor enthält oder nicht, absolut nichts beweisen kann, liegt auf der Hand. Wir werden weiter unten Gründe anführen, die entschieden dafür sprechen, dass das Chlor ein integrierender Bestandtheil des genuinen Pepsinmoleküls ist.

Zu unseren Versuchen dienten und dienen noch jetzt vorwiegend 2 Hunde, von denen der eine 46 Kilo schwer, im October 1899, der andere, 23 Kilo schwer, im November des gleichen Jahres operirt wurde. Für die Magenfistel benutzten wir silberne Canülen mit leicht gewölbten Rändern. Sie haben den Vortheil, dass sie vom Magensaft nicht angegriffen werden und andererseits durch den inneren Rand die Schleimhaut nicht reizen. Die Thiere wurden mit Pferdefleisch, Brod, Hafersuppe und Milch ernährt, die ihnen durch die Magenfistel 2 Mal am Tage hineingebracht wurden. Die Nahrungszufuhr wurde so regulirt, dass die Thiere, nachdem sie von den beiden Operationen sich erholt haben, noch einige Kilo an Gewicht zunahmen und dann ihr Körpergewicht annähernd constant blieb. Von Zeit zu Zeit wurden dem verfütterten Fleisch einige Gramm Kochsalz zugesetzt. Bei sorgfältiger Pflege, Ausspülen des Magens bei eingetretener Indigestion mit Creosotwasser und peinlicher Reinlichkeit bleiben die Thiere Jahre lang gesund und liefern stets reinen Saft. Wir entnahmen unseren Hunden in der Regel 2 Mal in der Woche durch die Scheinfütterung je 400—500 ccm. Saft. Ausserdem erhielten wir öfters aus der Abtheilung von Professor Pawlow auf gleiche Weise gewonnenen Magensaft, so

dass wir genug Gelegenheit hatten, individuelle Schwankungen dieses Secretes und seine Abhängigkeit von der Ernährung zu studiren.

In seiner Abhandlung spricht Pekelharing die Vermuthung aus, dass das von ihm aus Schweinemagen dargestellte künstliche Pepsin identisch sei mit dem körnigen Pepsin, das Frau Schoumow-Simanowski durch Abkühlung des natürlichen Magensaftes vom Hunde erhalten hat. Nach unseren Versuchen ist diese Vermuthung durchaus richtig. Wir können ferner ergänzend hinzufügen, dass nach gleichem Verfahren, wie das für seine Extracte angewendete, auch aus natürlichem Magensaft ein Pepsin erhalten wird, das in jeder Beziehung genau so wie das Pepsin von Pekelharing sich verhält und nach dem üblichen Sprachgebrauch als damit identisch erklärt werden könnte.

Wird frischer Magensaft von gastro- und ösophagotomirten Hunden in Portionen von ca. 500 ccm. im Pergamentschlauch<sup>1)</sup> gegen die 20fache Menge destillirten Wassers 24 Stunden lang dialysirt, so wird der Schlauchinhalt trübe und der Säuregehalt erheblich vermindert, sodass die Acidität des Schlauchinhalts auf 0,025—0,03% sinkt. Die trübe Flüssigkeit haben wir in Centrifugenflaschen etwa 15 Stunden bei 0° stehen gelassen, wobei sich ein Theil der Trübung zu Boden setzte und beim nachherigem Centrifugiren ein fest am Boden des Gefässes haftender, klebriger Niederschlag entstand, während die Flüssigkeit meistens vollkommen klar wurde. Lässt man Magensaft gegen fließendes Wasser und längere Zeit dialysiren, so geht der in den ersten 24 Stunden entstandene Niederschlag wieder in Lösung über, kann aber durch Zusatz von Salzsäure bis zu 0,02—0,03% von Neuem hervorgerufen werden. Also genau so, wie dies Pekelharing von seinem künstlichen Magensaft angibt.

---

<sup>1)</sup> Der von uns verwendete Dialysenschlauch aus Pergamentpapier wurde stets vor dem Gebrauch mit 0,5%iger HCl gefüllt und mehrere Tage lang gegen fließendes Wasser dialysirt. Wir fanden, dass die Schlauchwand an Wasser nicht unerhebliche Mengen von Calciumsulfat abgibt, die vorerst entfernt werden mussten.

gewaschene Centrifugenniederschlag löst sich in 0,2—0,5%iger Salzsäure bei der Bruttemperatur vollkommen klar auf und die Lösung hat alle Eigenschaften des ursprünglichen Magensaftes, nur ist die Enzymwirkung ein wenig schwächer. Dies rührt davon her, dass ein Theil des Pepsins noch immer in der Schlauchflüssigkeit gelöst bleibt. Wird Magensaft zum Kochen erhitzt, so scheidet sich daraus das Nucleoproteid, auf das wir noch später zurückkommen werden. Wir haben nun in 100 ccm. des ursprünglichen Saftes das durch die Hitze fällbare Nucleoproteid bestimmt und einen grösseren Theil des gleichen Saftes gegen die 10fache Menge destillirten Wassers 24 Stunden lang dialysirt, nach dem Stehen in der Kälte und Centrifugiren, den Niederschlag abfiltrirt, in 100 ccm. des Filtrates durch Kochen das Nucleoproteid gefällt und den abgeschiedenen Nucleoproteidniederschlag nach dem Waschen und Trocknen gewogen. Aus der Gewichts-differenz der beiden Nucleoproteidniederschläge haben wir dann berechnet, wie viel Pepsin unter diesen Verhältnissen noch in Lösung blieb. In 3 Bestimmungen erhielten wir folgende Zahlen:

Hund A: in 100 ccm. des ursprünglichen Magensaftes gefunden Nucleoproteid 0,0688 g. In 100 ccm. des Filtrates vom Centrifugenniederschlag gefunden 0,0126 g = 18,3 % Nucleoproteid in Lösung geblieben.

Hund A: aus 100 ccm. des Magensaftes erhalten = 0,085 g Nucleoproteid, in 100 ccm. des Filtrates vom Centrifugenniederschlag gefunden 0,0196 g Nucleoproteidniederschlag = 23 % Pepsin in Lösung geblieben.

Hund B: aus 100 ccm. frischen Magensaftes erhalten 0,0932 g Nucleoproteid und aus 100 ccm. des Filtrates vom Centrifugenniederschlag erhalten 0,0204 g Nucleoproteid oder in Lösung gebliebenes Pepsin 21,88 %.

Im Mittel aus den 3 Bestimmungen bleibt also etwa der fünfte Theil des Pepsins in Lösung. Immerhin ist die durch das Dialysiren und Centrifugiren aus dem Magensaft erhaltene Pepsinmenge viel grösser, als die des durch die Kälte abgeschiedenen körnigen Pepsins. Im Mittel aus den 3 Be-

stimmungen von Frau Schoumow-Simanowski beträgt die durch die Kälte abgeschiedene Pepsinmenge von der im Magensaft enthaltenen kaum 5 %.

Wir haben vergleichsweise einerseits den ursprünglichen Magensaft, andererseits den Centrifugenniederschlag, in dem ursprünglichen Volumen gleich starker Salzsäure gelöst, auf ihre Wirkung auf geronnenes Eiereiweiss, Milch und Albumosen geprüft. Im Mittel aus 30 Versuchen war die Verdauungskraft für geronnenes Eiereiweiss, nach Mette bestimmt, für den gelösten Centrifugenniederschlag etwa auf  $\frac{1}{4}$  herabgesetzt; ebenso gerann die Milch etwas später und auch die Bildung des Plasteins aus Albumosen nach Danilewski war verzögert und seine Menge geringer. Man kann aber auch umgekehrt durch concentrirtere Lösungen des Centrifugenniederschlags viel energischere Enzymwirkung als beim ursprünglichen Magensaft erzielen. So haben wir beispielsweise den Centrifugenniederschlag von 500 ccm. Magensaft in 100 ccm. 0,5%iger Salzsäure durch 15 Minuten langes Stehen im Thermostaten in Lösung gebracht. Die Verdauungskraft des ursprünglichen Magensafte, nach Mette bestimmt, war = 4,7 mm, die Verdauungskraft des Niederschlages dagegen 7,6 mm. Ein anderer Theil der letzteren Lösung wurde mit 0,1%iger Normalnatronlauge genau neutralisirt und 1,0 ccm. davon zu 10 ccm. frischer, brutwarmer Milch zugesetzt, worauf die Milch fast momentan coagulirte. Nach 15 stündigem Stehen im Thermostaten war das Caseingerinnsel vollkommen gelöst und nur mit darauf schwimmender Fettschicht bedeckt. Ebenso gab Albumose-lösung, nach Danilewski bereitet, einen viel reichlicheren Niederschlag von Plastein als ceteris paribus der ursprüngliche Magensaft. Aus dem Magensaft können auf diese Weise sehr wirksame Enzymlösungen bereitet werden; einfacher ist es allerdings, durch Aussalzen des Saftes mittelst Ammoniumsulfat die Enzyme daraus zu isoliren und durch Vermischen mit Zucker, Eiweiss oder Glycerin in haltbarer Form aufzubewahren. Wie schon oben erwähnt, gibt Pekelharing an, dass der von ihm erhaltene Centrifugenniederschlag, rasch zum Kochen erhitzt, in ein Nucleoproteid, eine Albumose und

seinen Analysen enthält das Nucleoprotein 0,5% Phosphor und gibt, mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, Alloxurbasen. Friedenthal,<sup>1)</sup> der mit Recht gegen Pekelharing betont, dass das Pepsin aus dem neutralisirtem Magensaft nicht durch Aufkochen, sondern durch die kochende verdünnte Salzsäure gefällt wird, ergänzt die Beobachtungen Pekelharing's dahin, das aus dem Nucleoprotein nicht allein Alloxurbasen, sondern auch Pentose abgespalten wird. Die Natur der in Alkohol löslichen Substanz, die Pekelharing als Spaltungsprodukt des genuinen Pepsins ansieht, hat er nicht näher festgestellt und nur ermittelt, dass sie, mit Soda und Salpeter geschmolzen, eine phosphorreiche Asche gibt.

Auch in dieser Hinsicht stimmen unsere, an reinem Magensaft gemachten, Beobachtungen mit den Angaben Pekelharing's überein. Wird frischer Magensaft, oder der in 0,5%iger HCl gelöste Centrifugenniederschlag rasch zum Kochen erhitzt, so entsteht ein reichlicher, flockiger Niederschlag, vorwiegend aus dem Nucleoprotein, zum geringeren Theil aus der in Alkohol löslichen Substanz bestehend. In dem Filtrat davon gibt Ammoniumsulfat, bis zur Sättigung eingetragen, einen flockigen Niederschlag, der die Biuretreaction gibt und offenbar die Albumose Pekelharing's ist. Das auf dem Filter durch Waschen mit Alkohol von der darin löslichen Substanz befreite Nucleoprotein, mit verdünnter Schwefelsäure zersetzt, gibt sowohl die Alloxurbasen wie auch die Pentose. Von der Anwesenheit der letzteren haben wir uns sowohl durch die Orcin- wie durch die Resorcin-Probe respective die charakteristischen Absorptionsbänder im Spectrum überzeugt.

Frau Schoumow-Simanowski hat in ihrem nur durch die Kälte abgeschiedenen Pepsin nach langem Waschen mit Alkohol keine Phosphorsäure gefunden. Pekelharing vermuthet, dass gerade durch Alkohol das Pepsin angegriffen wird und dabei seinen Phosphor verliert. Diese Vermuthung ist insofern richtig, als die in Alkohol lösliche Substanz, die zu-

---

1) Archiv f. Anat. u. Physiol., Physiol. Abth., Jahrg. 1900, S. 186.

sammen mit dem Nucleoproteid ausfällt, phosphorhaltig ist. Wenn aber schon durch Waschen mit Alkohol diese Substanz entfernt werden kann, so lag die Vermuthung nahe, dass sie dem ursprünglichen Centrifugenniederschlag entweder nur mechanisch beigemischt ist oder, was wahrscheinlicher, zu einer sehr lockeren Verbindung mit dem Pepsin verbunden sei. Eine weitere Konsequenz dieser Hypothese ist es, dass ebenso leicht, wenn nicht leichter, wie durch Waschen mit Alkohol, auch durch Waschen mit Wasser, resp. die Dialyse eine Abspaltung einzelner Bestandtheile aus dem ursprünglichen Molekül des Pepsins geschieht. In dieser Annahme wurden wir noch bestärkt, als wir fanden, dass nach 24stündiger Dialyse von 500 ccm. Magensaft gegen die 10fache Menge destillirten Wassers das Aussenwasser des Dialysators, auf ein kleines Volumen verdunstet, sehr starke Reactionen auf Phosphorsäure, Schwefelsäure, Sulfo-cyansäure, Kalk, Magnesia und Eisen gab. Bezüglich des letzteren Elementes im Magensaft sind die Angaben der Autoren nicht übereinstimmend. Bunge sagt in seinem Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie,<sup>1)</sup> dass von den in den Darm sich ergiessenden Secreten nach den bisherigen Analysen der Magensaft das eisenreichste und weit eisenreicher als die Galle sei. In einer vor Kurzem erschienenen Publication widerspricht dieser Angabe Bunge's Charles Dehrée,<sup>2)</sup> der den Saft aus einem nach der Methode von Frouin isolirten Blindsacke des Magens analysirte. Dehrée bestimmte das Eisen in dem Saft colorimetrisch und fand, dass darin nur Spuren von Eisen enthalten sind. Nach seinen Bestimmungen secernirte ein 16 kg schwerer Hund in dem Magensaft innerhalb 24 Stunden nicht mehr als 0,25 mg Eisen.

Um den wahren Sachverhalt zu ermitteln und dadurch auch einen besseren Einblick in die chemische Zusammensetzung des Pepsins zu erhalten, haben wir den Phosphor- und Eisengehalt und zwar: 1. in dem reinen Magensaft, 2. in dem aus dem Magensaft erhaltenen Centrifugenniederschlag und 3. in dem mit Alkohol ausgewaschenen Nieder-

---

1) 3. Auflage, 1894, Seite 87.

2) Journal de Physiolog. et Patholog. générale, t. 2, page 524, 1900.

fugenniederschlage den Chlorgehalt vor und nach der Behandlung mit Alkohol. Durch diese Bestimmungen bezweckten wir, eine Aufklärung über die mehr oder weniger feste Bindung dieser Elemente im Pepsinmolekül zu erhalten.

Bei dem geringen Gehalte des Magensaftes resp. des Pepsinniederschlages an diesen Elementen mussten wir erst einige analytische Schwierigkeiten überwinden und zuverlässige Bestimmungsmethoden ermitteln. Nach mehrfachen Versuchen sind wir bei folgendem Verfahren stehen geblieben.

Die bis zum constanten Gewichte bei  $110^{\circ}$  C. getrocknete Substanz wurde im Porzellantiegel mit einem einfachen Brenner bei sehr langsam steigender Temperatur verascht. Solche Veraschung von 0,5 bis 2,0 g Substanz erfordert 20 bis 30 Stunden. Die Asche hatte immer eine röthliche Färbung, vom Eisenoxyd herrührend. Qualitativ wurde darin auch Kalk nachgewiesen. Da wo es sich nicht um Aschebestimmung handelte, wurde der trockene Niederschlag durch Schmelzen mit Kali und Salpeter direkt verbrannt und in beiden Fällen die Asche in möglichst wenig Salzsäure gelöst und aus der Lösung zunächst die Phosphorsäure mit Molybdänlösung gefällt. Der nach 24stündigem Stehen abgeschiedene Molybdänniederschlag wurde durch ein kleines, aschefreies Filter filtrirt, mit möglichst wenig einer Lösung von salpetersaurem Ammon in Salpetersäure (5%  $\text{NO}_3 \text{NH}_4$  + 1%  $\text{NO}_3 \text{H}$ ) nachgewaschen, in  $\text{NH}_3$  gelöst und die nicht mehr als 30 bis 50 ccm. betragende Lösung mit etwas Magnesiamixtur gefällt. Der nach 2- bis 3tägigem Stehen abgeschiedene Niederschlag wurde wie üblich als pyrophosphorsaure Magnesia gewogen.

Das Filtrat vom Molybdänniederschlag wird mit Ammoniak übersättigt und einige Stunden auf dem warmen Wasserbade digerirt. Das abgeschiedene Eisenoxyd, dem öfters Kalk beigemischt ist, auf ein kleines Filter filtrirt, wird vollkommen ausgewaschen, in Salzsäure gelöst und nach Knorre<sup>1)</sup> mit Nitroso- $\beta$ -Naphtol in essigsaurer Lösung gefällt. Nach

---

<sup>1)</sup> G. Knorre, Berichte der Deutschen chem. Gesellschaft Bd. 20, S. 283 und Zeitschrift für analytische Chemie, Bd. XXVIII, S. 234.



3tägigem Stehen wird der Niederschlag filtrirt, mit 50/oiger Essigsäure nachgewaschen, getrocknet, unter Zusatz von etwas Ammonnitrat geglüht und als Eisenoxyd gewogen.

Diese gewichtsanalytische Bestimmung des Eisens ist, selbst da, wo nur einige Milligramme gewogen werden, jeder colorimetrischen Bestimmung vorzuziehen. Wir haben versucht, das Eisen mit dem Ferrometer von Jolles zu bestimmen, erhielten aber keine übereinstimmenden Zahlen. Die Nüance des erhaltenen sulfocyansauren Eisenoxyds war häufig eine andere, als wie die der Normallösung und blieb auch bei wechselnden Concentrationen von der Normallösung verschieden. In der Vermuthung, dass in der Asche neben Eisen auch Mangan enthalten sein könnte, haben wir die Asche des Magensaftes wiederholt nach dem empfindlichen Verfahren von P. Pichard<sup>1)</sup> auf Mangan geprüft. Das Resultat war stets negativ.

Da, wo wir neben Phosphorsäure und Eisen auch Chlor bestimmen wollten, wurde die abgewogene Substanz nach Carius mit reiner, starker Salpetersäure und etwas Silbernitrat im zugeschmolzenen Rohre — bei grösseren Substanzmengen in 2 verschiedenen Röhren — Anfangs 2 Tage lang auf dem Wasserbade, wobei jeden Tag die Gase herausgelassen wurden, hernach bei 200°, bis kein Druck mehr vorhanden war, erhitzt. Der Röhreninhalt wurde hierauf sammt dem Waschwasser bis zum Verjagen der Salpetersäure auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand mit Wasser aufgenommen, das abgeschiedene AgCl auf ein gewogenes trockenes Filter gebracht und nach dem Trocknen bei 110° zurückgewogen. Aus dem Filtrate vom AgCl wurde das überschüssige Ag durch HCl gefällt, das Filtrat davon auf dem Wasserbade verdunstet, der Rückstand mit etwas Wasser aufgenommen und daraus zunächst die Phosphorsäure, sodann das Eisen, wie oben angegeben, abgeschieden.

Wird Magensaft selbst in Vacuo bei 35 bis 40° verdunstet, so schwärzt sich der Rückstand durch die stark con-

---

<sup>1)</sup> Compt. rend. t. 176, p. 550 und 1882, auch Maly's Jahresber. für Thierchemie 1898, S. 521.



wo uns die Aschebestimmung nicht nothwendig war, den Säuregehalt titrimetrisch bestimmt und mit der genau erforderlichen Menge Natronhydrat neutralisirt. Die neutrale Lösung wurde auf dem Wasserbade verdunstet, sodann auf 110° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet, von dem Trockengewicht das Gewicht des entstandenen NaCl abgezogen und so der Gehalt an festem Rückstande im Saft ermittelt.

In der folgenden Tabelle geben wir zunächst den Gehalt des Saftes an festem Rückstand, Phosphor und Eisen, die beiden letzten in Procenten des festen Rückstandes. Für jede Bestimmung wurden je 400 ccm. Magensaft, wie eben angegeben, mit Natronhydrat neutralisirt und verarbeitet.

Tabelle Nr. I.

Nr.	Säuregehalt auf HCl bezogen in 100 ccm. des Magensaftes	Fester Rückstand in 100 ccm. des Saftes in g	Phosphorgehalt in Procenten des festen Rückstandes	Eisengehalt in Procenten des festen Rückstandes
1	0,55 %	0,2632 g	0,71 %	0,61 %
2	0,50 %	0,3647 »	0,24 %	0,20 %
3	0,56 %	0,3319 »	0,27 %	0,44 %
4	0,54 %	0,3405 »	0,22 %	0,28 %
5	0,51 %	0,4074 »	0,25 %	0,63 %
6	0,54 %	0,1600 »	0,54 %	0,36 %
7	0,52 %	0,2972 »	0,37 %	0,67 %
8	0,51 %	0,2872 »	0,73 %	0,47 %
Im Mittel	0,53 %	0,306 g	0,41 %	0,42 %

Die Tabelle II gibt die Chlor-, Phosphor- und Eisenbestimmungen in dem durch Centrifuge abgeschiedenen Pepsinniederschlage, der auf folgende Weise gewonnen wurde:

Frischer Magensaft wurde im Pergamentschlauch 24 Stunden lang gegen die zehnfache Menge destillirten Wassers dialysirt, der trübe Schlauchinhalt 15 bis 20 Stunden bei 0° stehen gelassen und sodann centrifugirt, wobei am Boden der Flaschen ein teigiger, schleimiger Niederschlag sich absetzte, von welchem die obenstehende, meistens ganz klare Flüssigkeit vollkommen abgegossen werden konnte. Der klebrige

auf ein Filter gebracht und, ohne weiter gewaschen zu werden, vom Filter mit einem Spatel abgehoben und auf Uhrgläser im Vacuo über concentrirter  $\text{SO}_4\text{H}_2$  und Aetznatron getrocknet. Nach dem Trocknen liess sich die Substanz leicht pulvern und verlor bei  $107^\circ$  im Luftbade fast nichts mehr an Gewicht. Nachdem wir so von 2 bis 4 Liter Saft Pepsin gesammelt haben, wurde darin nach dem oben beschriebenen Verfahren zunächst das Chlor, sodann die Phosphorsäure und hierauf das Eisen bestimmt.

Tabelle Nr. II.

Nr.	Durch die Centrifuge abgeschiedenes Pepsin bei $107^\circ$ getrocknet	Chlor	Phosphor	Eisen
		in Procenten des trockenen Pepsins		
1	0,7784 g	0,48 %	0,104 %	0,117 %
2	0,5130 „	0,47 %	0,148 %	0,151 %
3	1,0372 „	0,48 %	0,073 %	0,11 %
4	0,4304 „	0,47 %	0,091 %	0,18 %
Im Mittel		0,475 %	0,104 %	0,16 %

In einer dritten Versuchsreihe haben wir den auf gleiche Weise durch die Centrifuge erhaltenen Pepsinniederschlag auf dem Filter so lange mit 96%igem Alkohol gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr auf Chlor reagirte. Die Substanz wurde hierauf bis zum constanten Gewichte bei  $105^\circ$  getrocknet, im Porcellantiegel verascht und in der Asche die Phosphorsäure, das Eisen und in einem Falle auch das Chlor bestimmt. Die erhaltenen Zahlen sind in der Tabelle Nr. III zusammengestellt.

Tabelle Nr. III.

Nr.	Pepsinnieder- schlag mit Alko- hol gewaschen und bei $105^\circ$ getrocknet in g	Asche in Procenten des trockenen Pepsins	Eisen in Procenten des trockenen Pepsins	Phosphor in Procenten des trockenen Pepsins	Chlor in Procenten des trockenen Pepsins
1	1,813 g	0,457 %	0,119 %	0,046 %	—
2	2,1758 „	0,389 %	0,158 %	0,045 %	0,188 %
3	0,6622 „	0,439 %	—	0,091 %	—
4	0,7108 „	0,309 %	0,068 %	0,055 %	—
Im Mittel		0,399 %	0,115 %	0,059 %	0,188 %

1. Zunächst fällt auf der geringe Gehalt an festen Stoffen im Magensaft des Hundes, bei dem wir vorwiegend diese Bestimmungen gemacht haben. Der Hund, an dem die Frau Schoumow-Simanowski ihre Versuche angestellt hat, hatte in seinem Saft im Minimum 0,428%, im Maximum 0,6%, im Mittel 0,53% festen Rückstand. Ihr Versuchshund erhielt täglich 700 g Fleisch, 600 g Brod, 1 Liter Milch und 1 Liter Wasser. Unser 26 Kilo schwerer Hund erhielt täglich 1,2 Kilo Fleisch, 400 g Brod und 1 Liter Hafersuppe. Obgleich die Zufuhr an Wasser eine geringere war, ist bei unserem Hunde der Gehalt an festem Rückstand ein kleinerer. Dies hat seinen Grund darin, dass unser Hund verhältnissmässig weniger Kohlehydrate erhielt. Als wir das Verhältniss der Nahrungsstoffe in der Weise änderten, dass der Hund 500 g Fleisch, 600 g Brod und 1 Liter Hafersuppe erhielt, schwankte der Gehalt an festem Rückstand zwischen 0,3—0,4%, war also entschieden merklich höher als wie bei überwiegender Fleischnahrung.

Den geringsten Schwankungen, nicht allein bei diesem Hunde, sondern, wie wir dies auf Grund zahlreicher Bestimmungen des Magensaftes anderer Hunde sagen können, ist die Acidität des Magensaftes unterworfen. Beim schwankenden Gehalte an festem Rückstand, Eisen und Phosphorsäure ist der Gehalt an Salzsäure ein relativ constanter.

Im Mittel aus den acht Bestimmungen in frischem Magensaft ist der Phosphorgehalt desselben, auf festen Rückstand bezogen, = 0,41% und der des Eisens = 0,42%. Beide Zahlen sind aber bei demselben und gleich ernährten Hunde grossen Schwankungen unterworfen. Den höchsten Gehalt an diesen beiden Elementen fanden wir in frischem Magensaft, schon geringer in dem durch die Centrifuge abgeschiedenen und am geringsten in dem mit Alkohol gewaschenen Pepsin.

Ein Vergleich der drei Tabellen zeigt ferner noch folgende Eigenthümlichkeiten:

Wenn wir das Verhältniss von Phosphor zu Eisen, wie es im phosphorsauren Eisen ( $\text{PO}_4\text{Fe} = 31 : 56$ ) enthalten ist,

berücksichtigen (s. Tabelle Nr. I), so enthält der Magensaft erheblich mehr Phosphorsäure, als es zur Bindung sämtlichen Eisens erforderlich ist. Umgekehrt zeigt die Tabelle Nr. II, dass hier das Verhältniss von Phosphor zu Eisen fast ein äquivalentes ist. Wir fanden im Mittel auf 1 Theil Phosphor 1,6 Theile Fe, während das Aequivalent  $31 : 56 = 1 : 1,8$  ist. Freilich schwanken die einzelnen Bestimmungen, wie es bei so geringen Mengen dieser Elemente kaum anders zu erwarten war, in ziemlich weiten Grenzen. Die Tabelle Nr. III zeigt uns, dass durch Waschen mit Alkohol das Pepsin mit dem Lecithin fast die Hälfte des Phosphors verliert, der Verlust an Eisen aber ist nur ein geringer.

Der Vergleich der Tabellen I und II zeigt uns auch, dass ein erheblicher Theil des Eisens und der Phosphorsäure bei der Dialyse in das Aussenwasser übergeht. Von 0,42% sinkt der Eisengehalt auf 0,16% und der des Phosphors von 0,41% auf 0,10%.

Das anscheinend äquivalente Verhältniss von Phosphor zu Eisen, sowie der constante Chlorgehalt im Centrifugenniederschlag machten auf uns den Eindruck, dass wir ein chemisches Individuum vor uns haben. Wir haben daher auch die übrigen Elemente in dem in Tabelle II sub Nr. 4 angeführten Präparate bestimmt und erhielten folgende Zahlen:

0,5024 g im Porzellantiegel geglüht, hinterliessen 0,0029 g Asche = 0,57%.

0,2522 g = 0,2508 g aschefreier Substanz gaben 0,4714 g CO<sub>2</sub> und 0,1520 g H<sub>2</sub>O = 51,26% C und 6,74% H.

0,2610 g gaben 19,8 ccm. N-Gas bei 759 mm. Barometerstand und 16,8° Temperatur über 30% KOH oder 14,33% N aschefrei berechnet.

0,7784 g gaben 0,0865 g SO<sub>4</sub>Ba oder 1,5% S.

Diese Zahlen sind nur wenig abweichend von der von Frau Schoumow-Simanowski für das durch die Kälte oder durch Ammonsulfat abgeschiedene Pepsin, zumal wenn man berücksichtigt, dass sie ihre Analysen ohne Abzug der Asche berechnete. Der grösste Unterschied betrifft das Chlor, wovon wir in dem durch die Centrifuge abgeschiedenen Pepsin etwa nur halb so viel gefunden haben. Gross ist aber der Unterschied im Phosphorgehalte zwischen dem unsrigen und dem

unserem Pepsin nur den zehnten Theil davon.

Aus der Tabelle Nr. III geht hervor, dass durch Waschen mit Alkohol der Pepsinniederschlag erheblich viel an Chlor und Phosphor verloren hat. Nach langem Waschen mit Alkohol hat diese Substanz auch ihre Enzymeigenschaften verloren. Sie verdaut Eiweiss nicht, bringt Milch nicht zur Gerinnung und verwandelt die Albumosen nicht in Plasteine. Wird dagegen der Centrifugenniederschlag kurze Zeit und rasch mit Alkohol gewaschen, jedoch so, dass in dem mit Wasser verdünnten Filtrate Silbernitrat keine Trübung erzeugt, so löst sich der sofort vom Filter abgehobene Niederschlag in 0,5% HCl auf und ist in allen den drei Enzymrichtungen, wenn auch etwas schwächer als der nicht mit Alkohol gewaschene Centrifugenniederschlag, wirksam. Ihren Nucleoproteidcharakter hat die Substanz insofern behalten, als sie nach dem Waschen mit Alkohol, mit verdünnter Schwefelsäure gekocht, sowohl die Alloxurbasen, als auch die Pentosereactionen gibt.

Um zu erfahren, wieviel das durch die Centrifuge abgeschiedene Pepsin durch Waschen mit Alkohol am Gewichte verliert, haben wir 0,7741 g der bei 110° getrockneten Substanz im Extractionsapparate mit heissem Alkohol so lange behandelt, bis der letztere nichts mehr aufnahm. Die alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade verdunstet und der Rückstand im Vacuo über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  getrocknet. Sein Gewicht war = 0,0772 g oder 9,97%. In dem mit heissem Alkohol völlig erschöpften Pepsin wurde noch Chlor, Phosphor und Eisen bestimmt. Von den 2 ersten Elementen wurden nur minimale Mengen gefunden. Der Eisengehalt schien dagegen nicht vermindert zu sein. Wir fanden darin 0,10% Cl, 0,08% P und 0,185% Fe. vom Gewichte des trockenen, mit Alkohol extrahirten Pepsins.

Dass beim Waschen des Centrifugenniederschlages mit Alkohol eine darin lösliche phosphorhaltige Substanz ausgewaschen wird, hat schon Pekelharing angegeben, jedoch über ihre Natur nichts Näheres mitgetheilt. Nach unseren

---

1) l. c. S. 236.

Beobachtungen verbleibt nach Verdunsten des Alkohols eine wachsartige, amorphe Masse, die auf Platinblech wie Fett mit russender Flamme verbrennt und die in Aether, wenn auch weniger leicht, löslich ist. Der nach Verdunsten des Aethers hinterbliebene Rückstand, mit Kali geschmolzen, mit wenig Wasser aufgenommen und angesäuert, gibt mit Molybdänlösung den charakteristischen gelben Niederschlag von Phosphormolybdänsäure. In Wasser ist diese wachsartige Substanz nur theilweise löslich, theilweise schwimmen Oeltropfen darauf, die unter dem Mikroskope die bekannten für das Lecithin charakteristischen Myelinformen zeigen. Alles dies spricht dafür, dass das durch die Centrifuge abgeschiedene Pepsin Lecithin enthält, das schon durch Waschen mit Alkohol aus dem Pepsin entfernt wird. Leider war die Menge dieser lecithinartigen Substanz zu gering, um ausser den qualitativen Reactionen durch genauere Elementaranalysen ihre Zusammensetzung festzustellen. Wir hoffen in einiger Zeit die dafür nöthigen Quantitäten zu gewinnen und behalten uns weitere Mittheilungen darüber vor. Es sei nur bemerkt, dass die im Pepsin enthaltene Lecithinmenge, die nach der obigen Bestimmung circa 10% beträgt, in Wirklichkeit eine grössere sein muss. Wir haben bei der Dialyse des vollkommen klaren Magensaftes auch das Aussenwasser gesammelt und genauer untersucht. Dieses Aussenwasser wurde mit reiner Soda bis zu ganz schwach saurer Reaction neutralisirt, auf dem Wasserbade auf ein kleines Volumen verdunstet und qualitativ, zum Theil auch quantitativ auf die aus dem Saft in das Aussenwasser übergegangenen Bestandtheile geprüft. Wir haben auf diese Weise das Aussenwasser von über 10 Liter Magensaft verarbeitet und darin Stoffe nachgewiesen, die wir direkt im Saft nicht nachweisen konnten. So hat der eine von uns<sup>1)</sup> schon früher beobachtet, dass der Magensaft Sulfoocyansäure enthält; öfters, jedoch nicht immer, war der Gehalt des Saftes an dieser Säure so gross, dass wenige Cubikcentimeter davon, mit einigen Tropfen Eisenchlorid versetzt, gelbrothe bis rothe

---

<sup>1)</sup> Berl. chem. Ber., Bd. 28, Seite 1318.

Hunde die Sulfocyansäure auch dann vermisst, wenn wir 100 bis 300 ccm. des Saftes mit Natronlauge neutralisirten, auf dem Wasserbade zur Trockne verdunsteten, den Rückstand mit wenig Alkohol extrahirten und nach dem Ansäuern mit Eisenchlorid auf Sulfocyansäure prüften. Es stimmt dies mit der kürzlich publicirten Mittheilung von Frouin<sup>1)</sup> überein, der selbst nach Verarbeitung von 500 ccm. Magensaft darin keine Sulfocyansäure finden konnte. In dem Saft des Hundes, an dem wir jetzt die meisten Bestimmungen gemacht haben, war ebenfalls, selbst nach Verarbeitung von 300 ccm., keine Sulfocyansäure nachweisbar; als wir aber 6 Liter des Saftes vom gleichen Hunde dialysirten, war in dem auf ein kleines Volumen eingeeengten Aussenwasser Sulfocyansäure mit Sicherheit vorhanden; denn alle darauf bezüglichen Reactionen fielen jetzt positiv aus. Bemerkenswerth ist es, dass der zweite bei unseren jetzigen Versuchen benutzte und gleich ernährte Hund in seinem Saft soviel Sulfocyansäure hatte, dass eine Probe davon durch Eisenchlorid sofort röthlichgelb gefärbt wurde. Wir kommen daher zu dem Resultat, dass Sulfocyansäure zwar ein constanter Bestandtheil des Magensaftes ist, jedoch öfters in so geringen Mengen darin vorkommt, dass trotz der empfindlichen Reagentien, die wir zum Nachweis der Sulfocyansäure besitzen, manchmal grössere Mengen des Saftes zum Nachweis dieser Säure verarbeitet werden müssen.

Als wir nun das Aussenwasser von 10 Liter Magensaft auf circa 100 ccm. concentrirten und die Lösung mit HCl ansäuerten, schied sich gegen unsere Erwartung eine ölige Fettschicht ab, die beim Stehen in der Kälte halbfest wurde und unter dem Mikroskope ausser Oeltropfen auch Fettkrystalle, denn beides war in Aether löslich, enthielt. Die ganze Flüssigkeit wurde jetzt mit Aether ausgeschüttelt und der Aetherextract auf dem Wasserbade verdunstet. Es hinterblieb ein Rückstand von halbfestem Fett, das, mit Kali und Salpeter

---

<sup>1)</sup> Comp. rend. Soc. biol., Bd. 51, Seite 583–584 und Maly's Jahresb. f. 1899, S. 344.

geschmolzen, mit Ammoniummolybdat eine starke Reaction auf Phosphorsäure gab. Wir schliessen daraus, dass schon durch Waschen mit Wasser, resp. durch die Dialyse aus dem Pepsin ein Theil des Lecithins entfernt wird.

Ausser Sulfocycansäure und Lecithin enthält das Aussenwasser, und zwar in relativ erheblicher Menge auch Eisen und Phosphorsäure. Wir haben beispielsweise das Aussenwasser von 1 Liter Magensaft gegen 10 Liter Wasser dialysirt, dann verdunstet und darin 0,0052 g P und 0,0036 g Fe gefunden. Ob diese beiden Elemente durch Dissociation aus dem Pepsinmolekül abgespalten wurden oder nur in Form von Salzen im Magensaft enthalten waren, lässt sich nicht entscheiden. Uns ist die erste Annahme die wahrscheinlichere.

Alle die von uns gemachten Beobachtungen sprechen entschieden dafür, dass das als Enzym wirksame Pepsinmolekül ein sehr labiles und complex zusammengesetztes ist. Das Eiweissmolekül ist in diesem Nucleoproteid, abgesehen von Eisen, Phosphorsäure und Pentose, auch noch mit Lecithin und Chlor verbunden.

Was das Chlor betrifft, so haben wir schon oben gezeigt, dass die Gefrierpunktsbestimmung zu der Entscheidung der Frage, ob das Chlor im Magensaft nur als freie Salzsäure oder zum Theil an das Pepsin gebunden vorkommt, nichts beweisen kann. Wir haben aber gesehen, dass selbst nach völligem Auswaschen des Pepsins mit Alkohol, wo der Waschalkohol nicht die geringste Reaction zeigt, das Pepsin noch immer, zwar minimale Mengen, Chlor enthält, die aber viel zu gross sind, um sie auf Rechnung des etwa nicht ausgewaschenen Chloralkalis zu bringen. Ein analoges Verhalten können wir aus eigener Erfahrung mit einer viel beständigeren chlorhaltigen Verbindung — nämlich dem Hämin — anführen.

Durch langes Waschen der Häminkrystalle mit kaltem Wasser wird ihr Chlorgehalt von 5,4% auf weniger wie 1% herabgedrückt. Das Chlor der Häminkrystalle ist nicht als Salzsäure darin enthalten, sondern sehr wahrscheinlich an Eisen gebunden. Werden die Häminkrystalle in Alkalien gelöst, so wird unter Bildung von Chloralkali das Chlor durch Hydroxyl



durch überschüssiges Alkali und langes Auswaschen ist die Verseifung nie eine absolut vollständige und das Hämatin enthält 0,1—0,4% Chlor.

In Bezug auf das Lecithin ist es bekanntlich F. Hoppe-Seyler, der zuerst die Vermuthung ausgesprochen hat, dass der phosphorhaltige Körper im Eidotter — das Vitellin — eine Verbindung mit Lecithin, ein Lecithalbumin sei. Später hat Leo Liebermann<sup>1)</sup> aus verschiedenen drüsigen Organen und speciell aus der Magenschleimhaut solche Lecithalbumine dargestellt und auf ihre Beziehung zu den Nucleinen hingewiesen. Liebermann constatirte, dass diese sauer reagirenden Lecithalbumine durch lange Behandlung mit Alkohol den grössten Theil des Lecithins, wenn auch nicht vollständig, verlieren. Offenbar hatte schon Liebermann die gleiche Substanz, allerdings in verändertem Zustande, in den Händen, die später Pekelharing aus der Magenschleimhaut und wir aus dem Magensaft durch Dialyse erhalten haben. Auf Grund seiner Untersuchungen ist H. J. Bing<sup>2)</sup> zu dem Resultate gekommen, dass das Jecorin von Drechsel eine additionelle Verbindung von Lecithin und Zucker sei. Solche molekulare Additionsprodukte wurden vom gleichen Autor von Lecithin mit den verschiedensten Substanzen, wie: Kochsalz, Natriumlactat, Morphin, Salicin u. s. w. dargestellt. Sie verhalten sich alle ähnlich wie das Jecorin, indem sie in Aether lösliche Verbindungen bilden, die durch Alkohol gefällt werden. Durch überschüssigen Alkohol werden sie wiederum ganz oder theilweise gelöst. Immer mehr bricht die Erkenntniss durch, dass in den organisirten Wesen das Vorkommen solcher unbeständiger, schon durch Wasser oder Alkohol leicht zersetzbarer Additionsverbindungen für die verschiedenen Zwecke des Stoffwechsels ein sehr verbreitetes ist.

Dass das Lecithin dem Pepsin nicht etwa mechanisch beigemischt ist, geht auch daraus hervor, dass der Saft im

---

<sup>1)</sup> Pflüger's Archiv, Bd. 50, S. 25—56 und Bd. 54, S. 573 f. und Maly's Jahresber. f. 1891, S. 240 und 167; 1892, S. 260; 1893, S. 32 und 239.

<sup>2)</sup> Skandin. Archiv f. Physiol., Bd. 9, S. 333; Bd. 11, S. 166.

Vacuo auf ein kleines Volumen concentrirt werden kann, wobei sich ebenso wie beim Abkühlen oder der Dialyse das wirksame, mit Lecithin verbundene Pepsin abscheidet. Bei hinreichender Entfernung der Salzsäure fällt also nicht etwa das Lecithin zuerst aus, sondern das mit dem Lecithin zu einem Ganzen verbundene Eiweissmolekül. Wird bei fortgesetzter Dialyse der Schlauchinhalt noch säureärmer gemacht, so geht der entstandene Niederschlag wieder als Ganzes in Lösung, ohne dass etwa das Lecithin von dem Eiweissmolekül sich abspaltet.

Bei objectiver Betrachtung können wir uns der Ansicht nicht verschliessen, dass das aus den Schleimhäuten verschiedener Thiere (Hund, Schwein, Pferd) von Pikelharing bereitete, sowie das durch die Abkühlung, durch die Dialyse oder durch das Aussalzen mit Ammonsulfat aus dem Magensaft erhaltene Pepsin den Eindruck einer einheitlichen Substanz macht und trotz der verschiedenen Darstellungsverfahren immer dasselbe Produkt, theilweise nur durch mehr oder weniger eingreifende Behandlung verändert, erhalten wird.

Wir kennen nun drei verschiedene Functionen des Magensaftes und zwar: 1. die peptonisirende oder eiweissverdauende Wirkung, 2. die Labwirkung und 3. die von Danilewski entdeckte und von seinen Schülern Okuneff, Lawrow und namentlich Sawjalow (vergl. Maly's Jahresber. für 1899, S. 55 u. 58) genauer untersuchte Wirkung des Saftes auf Albumosen, wodurch sie in unlösliche, dem geronnenen Eiweiss ähnliche Verbindungen übergeführt werden. Wenn auch die Labwirkung und die Plasteinbildung aus Albumosen analoge Erscheinungen sind und vielleicht durch dieselbe Enzymgruppe bewirkt werden, so ist doch die verdauende Wirkung des Pepsins eher eine entgegengesetzte der Casein- und Plasteinbildung. Da nun das durch die Kälte oder durch die Dialyse abgeschiedene Pepsin, wie wir auf Grund zahlreicher Versuche sagen können, sowohl Eiweiss verdaut als wie auch Milch zur Gerinnung bringt und Albumosen in Plasteine verwandelt, so müssten nach der herrschenden Ansicht über die specifische Wirkung der Enzyme, in diesem durch Dialyse abgeschiedenen Pepsin mindestens zwei, mög-

Nach unserer Meinung hat aber auch eine andere Vorstellung über die Natur der Enzyme ihre Berechtigung, sobald wir uns nur die Eigenschaften der so complex zusammengebauten Moleküle, denen wir bei physiologisch-chemischen Untersuchungen auf jedem Schritt begegnen, näher vergegenwärtigen. Diese andere Vorstellung ist nämlich die, dass ein und dasselbe Molekül verschiedenartige Enzymwirkungen haben kann.

Halten wir uns an die Maxwell'sche Definition einer Molekel, so wird darunter derjenige Stofftheil der Materie verstanden, der sich bei der Bewegung als ein Stück bewegt, wenn man bei der Bewegung den Mittelpunkt der Masse in Betracht zieht. Innerhalb der Molekel gibt es dann noch eine Bewegung der Constituenten in Bezug auf den Mittelpunkt. Nehmen wir ferner an, dass die Constituenten der Molekel Atome sind, aus welchen eben die Molekel besteht, und dass jedes Atom als Punkt sich bewegt, so muss jedes Atom in drei Richtungen des Raumes sich bewegen können und deshalb die Zahl der Variablen zur Bestimmung der Lage und Configuration der Atome schon dreimal grösser sein als wie die Atomzahl in der Molekel.

Vergegenwärtigen wir uns jetzt, dass die Molekel der complexeren Verbindungen aus einigen Hunderten und, wie bei Eiweisskörpern, aus mehreren Tausenden von Atomen bestehen, von denen wir wissen, dass sie bei der Einwirkung schon der gelindesten Reagentien, wie Wasser, verdünnte Säuren u. s. w. in mehrere, relativ noch sehr complexe Molekel zerfallen, so kommen wir zu dem Schlusse, dass in einer Riesenmolekel, die aus Eiweiss, Lecithin, Pentose, Phosphorsäure, Chlor u. s. w. besteht, die Bewegungen der einzelnen Atome einerseits so bestimmt werden, als ob sie aus den einzelnen Gruppen, nämlich des Eiweisses, des Lecithins, der Pentose u. s. w. bestünden und wiederum andererseits die Bewegungen der Lecithinmolekel, der Pentosenmolekel u. s. w. muss in einer bestimmten Weise beeinflusst werden, damit der Charakter der aus ihnen bestehenden Riesenmolekel als Ganzes gewahrt bleibe.

Wir haben dafür ein vorzügliches Beispiel im Häm-

globin, das zu 94% aus Globin und zu etwa 6% aus einem farbigen Complex — dem Hämochromogen — besteht. Das Hämochromogen geht sofort an der Luft in das inerte, relativ wenig veränderliche Hämatin über. Durch die lockere Verbindung mit Globin erhält das Hämochromogen ganz andere Eigenschaften; es oxydirt sich an der Luft langsamer, indem es in Oxyhämoglobin übergeht, welches letztere sehr leicht den Sauerstoff abgibt und wiederum zu Hämoglobin wird. Die Spannung und die Bewegung der Atome in einer solchen Riesenmolekel werden in bestimmter Weise modificirt und den Zwecken der Organismen angepasst.

In einer solchen Riesenmolekel hätten wir dann ausser dem Hauptmittelpunkte noch Centra 2., 3., 4. u. s. w. Ordnung, die für die Bewegungen der einzelnen Atome massgebend sind und die wir füglich als Seitenmolekel mit eigenen Mittelpunkten bezeichnen können. Da das Riesenmolekel des Pepsins beim Aufkochen des Magensaftes in Nucleoproteid, Albumose, Lecithin und Salzsäure zerfällt, so würden alle die genannten Verbindungen als Seitenmolekel oder Theilmolekel 1. Ordnung aufzufassen sein. Das Nucleoproteid zerfällt ferner mit Säuren gekocht in Eiweiss, Pentose und Alloxurbasen; das Lecithin in Fettsäuren, Glycerin, Phosphorsäure und Neurin. Die jetzt erhaltenen Spaltungsprodukte würden Theilmolekel 2. Ordnung sein u. s. w.

Das Bedürfniss nach einer solchen Auffassung der hochcomplexen Molekel zur Erklärung physiologisch-chemischer Vorgänge hat offenbar Ehrlich zur Aufstellung seiner Seitenkettentheorie veranlasst. — In einer Riesenmolekel werden die Theilmolekel verschiedener Ordnung verschiedene Configurationen haben und kann daher eine und dieselbe Molekel anscheinend ganz verschiedene Functionen verrichten. Wissen wir doch von den einfachsten Aminosäuren, dass sie einerseits wie Basen, andererseits wie Säuren sich verhalten. Die Auffassung ist daher durchaus correct, dass die gleiche Riesenmolekel vermöge einer von ihren Seitenmolekeln auf Eiweiss hydrolysirende Wirkung hat, während sie vermöge einer anderen ebenfalls in ihr vorhandenen Theilmolekel die Lab-

sagen, dass es nicht Enzyme gibt, die als ganze Molekel nur eine einzige, ihnen specifische Enzymwirkung ausüben. Zwischen solchen einfachsten Enzymen und dem sogenannten lebendigen Protoplasma, das als ein einziges Riesenmolekül die verschiedenartigen Enzymwirkungen ausübt, würden die Molekel mit mehrfacher Enzymwirkung in der Mitte stehen.

Zu dieser Kategorie von Enzymen würde also auch das Pepsinmolekül gehören. Speciell was das eiweisslösende Theilmolekül des Pepsinmoleküls betrifft, sind wir der Ansicht, dass in ihm das Chlor enthalten ist. Dafür spricht der Umstand, dass auch durch ganz verdünnte Alkalien die eiweisslösende Wirkung des Pepsins sofort vernichtet wird. Es erinnert diese Erscheinung lebhaft an die Umwandlung des Hämins in Hämatin. Schon durch ganz verdünnte Alkalien wird das Chlor durch Hydroxyl ersetzt und das sehr reactionsfähige Hämin, das z. B. schon durch 1‰ige Salzsäure ätherificirt wird, geht in das beständige, inerte Hämatin über.

Durch Neutralisation mit Alkali wird im Pepsin die Labgruppe nicht zerstört. Wie bekannt, ist das Labferment selbst bei alkalischer Reaction wirksam. Ebenso wird nicht allein durch den sauren, sondern auch durch den schwach alkalisch gemachten Magensaft und durch die käuflichen Labpräparate das Danilewski'sche Plastein aus den Albumosen gebildet. Ob die Caseingerinnung und die Plasteinbildung auf gleichem chemischen Processe beruhen, resp. durch die gleiche Enzymmolekel hervorgerufen werden, ist noch eine offene Frage. Jedenfalls ist Sawjalow im Irrthum, wenn er behauptet, dass durch das Labferment aus den Albumosen verschiedener Abstammung ein und dasselbe Plastein entsteht. Der Vorgang der Plasteinbildung erfordert noch eine viel genauere Untersuchung, zumal im günstigsten Falle nur etwa der vierte Theil der Albumose in Plastein verwandelt wird. So erhielt Sawjalow ceteris paribus aus Protalbumose 10,09%, aus Heteroalbumose 26,59%, aus Deuteroalbumose 2,85%, aus Amphopepton 0,92% und aus Antipecton 0,0% Plastein. (S. 137 seiner Dissertation, russisch.)

verändertes Pepsin enthalten, so sind sie, wie auch zu erwarten war, bezüglich der dreifachen Enzymwirkung nicht gleich. Wir haben in dieser Hinsicht das Pepsin Witte, das Pepsin von Jensen & Langebek-Petersen in Kopenhagen und ein von der chemisch-technischen Fabrik Waldemar Mayer's Wwe. & Sohn in Rewal bezogenes flüssiges Labferment untersucht. Die beiden ersten Präparate sind trockene Pulver, das Witte'sche stark zuckerhaltig und ihre wässerigen Lösungen reagiren schwach sauer. Das Rewal'sche Labferment reagirt alkalisch.

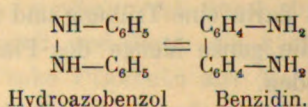
Die zwei ersten pulverigen Präparate hatten die dreifache Enzymwirkung des Pepsins in verschiedenem Grade. Am stärksten war die verdauende Wirkung beim Pepsin Witte, während das Pepsin Jensen-Langebek die stärkste Labwirkung zeigte. Dagegen war hier die Plasteinwirkung sehr gering. Das alkalische flüssige Labferment verdaute Eiweiss nicht. 1 ccm. davon coagulierte 10 ccm. brutwarmer Milch innerhalb 2 Minuten und bildete relativ die grösste Menge Plastein aus Danilewski's Albumose. Zu einer 10%igen brutwarmen Lösung des letzteren zugesetzt, erzeugte das Rewal'sche Präparat sofort darin eine Trübung und nach einer halben Stunde war schon die ganze Menge des Plasteins als dicker Bodensatz abgeschieden.

Hier ist noch ein Umstand zu berücksichtigen. — Es ist möglich und sogar wahrscheinlich, dass in den Extracten der Magenschleimhaut und auch im natürlichen Magensaft die Enzymgruppen nicht alle im activen Zustande sich befinden. Es bedarf einer kleinen Atomverschiebung in der Seitenmolekel, deren Natur uns bis jetzt unbekannt ist, damit das Zymogen zu Zymase wird.

Es ist leicht begreiflich, dass eine so hoch complexe Molekel, wie die des Pepsins aus verschiedenen Theilmolekeln bestehend, nicht die gleiche Cohäsionskraft wie eine einfache nur aus mehreren Atomen bestehende Molekel haben kann. An den letzteren wurden die Grundgesetze der Lehre von Atomen und Molekülen ermittelt. Die hoch zusammengesetzten

sind, können nicht ohne Zersetzung allen den physikalischen Veränderungen wie die einfachen Moleküle unterworfen werden.

Wir können z. B. Eiweiss nicht in den flüssigen, geschweige in den gasförmigen Zustand überführen. Andererseits muss eine so hoch complicirte Molekel die grösste Mannigfaltigkeit und Verschiedenheit gegenüber den chemischen, thermischen, elektrischen und auch mechanischen Agentien haben. Wir wissen, dass die meisten Eiweissstoffe nicht die Temperatur von über 60°, die Einwirkung der verdünnten Säuren, Alkalien, der Metallsalze, des Alkohols u. s. w. vertragen, ohne dabei molekulare Veränderungen zu erleiden. Die Gerinnung der Eiweissstoffe durch die Hitze beruht jedenfalls auf einer solchen Atomverschiebung aus einem labilen in einen mehr stabilen Zustand. Dabei erleidet wohl selten das ganze Riesenmolekül eine Polymerisation in dem Sinne, wie dies z. B. beim Uebergang der Cyansäure in die Cyanursäure der Fall ist, sondern es findet meistentheils die Atomverschiebung in einer Theilmolekel zu einer stabileren Form statt, ähnlich wie dies z. B. der Fall ist beim Uebergang des wenig beständigen Moleküls des Hydroazobenzols in die mehr stabile des Benzidins.



Ein solches Riesenmolekül mit verschiedenen Zymasemolekeln ist nach unserem Dafürhalten auch der wirksame Stoff des Hefepresssaftes. Ausser der von Buchner constatirten Bildung von Kohlensäure und Alkohol ist darin nach Cremer<sup>1)</sup> auch ein glycogenbildendes und nach Martin Hahn<sup>2)</sup> ein proteolytisches Enzym enthalten.

Unter den von Thier- und Pflanzenkörpern abgesonderten Enzymen gehört der Magensaft zu denjenigen, die am wenigsten fremde Beimischungen enthalten. Es ist ein Secret ad hoc, das einerseits das Eiweiss der Nahrung lösen und andererseits

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 32, S. 2062—2064.

2) Maly's Jahresber. f. 1899, S. 935.

mittelst des Labenzym in eine für den Organismus nöthige Form überführen soll. Die genauere Untersuchung dieses Secretes hat gezeigt, dass das wirksame Princip darin ein höchst complicirter, aus Eiweissstoffen, Lecithin und Pentose zusammengesetzter Körper ist, der ausserdem in seinem Molekül Chlor, Phosphorsäure und Eisen enthält. Die Untersuchung dieser Substanz hat aber ferner ergeben, dass die der organischen Chemie entlehnten Reinigungs- und Trennungsmethoden, wie das Waschen mit Wasser, Alkohol u. s. w., zersetzend auf diese Substanzen einwirken. Wir ersehen hieraus, wie illusorisch die Hoffnung ist, mittelst der bisherigen Isolirungs- und Trennungsmethoden chemisch reine Enzyme darzustellen. Um diesen Zweck zu erreichen, müssen erst neue, viel weniger eingreifende Untersuchungsmethoden gefunden werden.

Zum Schlusse möchten wir noch eine Thatsache bezüglich der Eiweissnatur der Enzyme hervorheben, die übrigens schon von Pekelharing in richtiger Weise beleuchtet wurde. Wiederholt wurde angegeben, dass durch Pepsinlösungen, die nicht die geringste Eiweissreaction zeigen, Eiweissstoffe doch verdaut werden. Ohne behaupten zu wollen, dass jedes Enzym nothwendig eine Proteinsubstanz sein muss, zweifeln wir nicht daran, dass das Pepsin ein complicirt zusammengesetzter Eiweisskörper ist; nur ist der, sozusagen, physiologische Nachweis der Enzyme ein viel empfindlicherer als wie die eigentlichen chemischen Eiweissreagentien. Nach den Bestimmungen von F. Hofmeister<sup>1)</sup> ist die Biuretreaction die mindestempfindliche. In einer alkalisch gemachten Lösung von 1:2000 gab vorsichtiger Zusatz von Kupfersulfat noch röthliche Färbung, in einer Lösung von 1:10000 nicht mehr. Zusatz von concentrirter Salpetersäure, sowie Kochen der mit concentrirter Kochsalzlösung und Essigsäure versetzten Flüssigkeit ergab bei 20000facher Verdünnung noch eine deutliche Trübung. Bei derselben Concentration fiel auch die Millon'sche Probe noch positiv aus, nicht aber in den

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. II, S. 291.



trachten noch in 50000facher Verdünnung deutliche Trübung hervor, nicht mehr deutlich aber bei 100000facher Verdünnung. Von den weniger für Eiweiss und mehr für Alkaloide charakteristischen Reagentien ergaben Tannin, Phosphorwolframsäure, Jodquecksilberkalium und Jodwismuthkalium noch in sauren Lösungen 1:100000 merkbare Trübungen. Pekelharing gibt aber an, dass einige Hundertstel eines Milligramms, ja selbst  $\frac{1}{1000}$  mg von seinem Pepsin in einigen Stunden eine Fibrinflocke auflösen.

In unseren Versuchen verdauten Lösungen, die in 10 ccm. halbprocentiger HCl 0,05 g des Magensaftes enthielten, Fibrin in einigen Stunden, und ihre Verdauungskraft für geronnenes Eiweiss, nach Mette bestimmt, war gleich 1,2 mm. In 1000 g des Saftes sind ca. 3 g festen Rückstands enthalten. Nehmen wir an, dass der ganze feste Rückstand nur aus Pepsin besteht, so waren in 1 ccm. der Lösung nur 0,000015 g Pepsin enthalten. Eine Menge, die noch durch die Alkaloidreagentien, nicht aber durch die gewöhnlichen Eiweissreagentien nachweisbar ist. In der That verhielt sich unsere Lösung gegenüber den Eiweissreagentien und selbst gegen Jodquecksilber- und Jodwismuthkalium negativ.

Herr Dr. Dzierzowski, der gerade zu gleicher Zeit mit der Untersuchung der pflanzlichen Enzyme in unserem Institute beschäftigt war, überbrachte uns ca. 100 ccm. des frischen, vollkommen klaren Saftes von *Nepenthes*, hauptsächlich von *Nepenthes messteriana* herrührend. Dieser Saft, von schwach saurer Reaction, der innerhalb einer Viertelstunde bei Bruttemperatur Fibrin vollkommen auflöste, gab mit den oben citirten Eiweissreagentien nicht die geringste Trübung resp. Färbung. Als Herr Dzierzowski aber diesen Saft im Vacuum bei 30° verdunstete, gab der auf einige Cubikcentimeter eingeengte Rückstand sowohl mit Salpetersäure, wie mit Essigsäure und Ferrocyankalium deutliche Trübung und wurde mit Millon's Reagens bei gelindem Erwärmen roth angefärbt.

Einen schlagenden Beweis dafür, dass der physiologische

Nachweis dieser labilen Proteine unvergleichlich empfindlicher als der chemische ist, haben wir in den Antitoxinen, welche allen bisherigen Untersuchungen zufolge den Enzymen sehr nahe stehen und ebenfalls zu den labilen, complexen Eiweissstoffen gehören.

1 ccm. des hochwerthigen, antidiphtheritischen Serums enthält 400—800 Antitoxineinheiten — im Mittel 600 Einheiten —. In 0,00166 ccm. ist also eine Heileinheit enthalten. 100 g Serum enthalten durchschnittlich 6 g Eiweisskörper. 1 ccm. des 600 fach verdünnten Serums enthält demnach 0,0001 g Eiweiss.

Das Diphtherieantitoxin ist in dem Globulinniederschlage des Serums enthalten. Nehmen wir an, dass der zehnte Theil des Serumeiweisses aus Antitoxin besteht, was sicher viel zu hoch gegriffen ist, so würde 1 ccm. des 600 fach verdünnten Serums etwa 0,00001 g Antitoxin enthalten. Als Einheit des Antitoxins gilt die 10 fache Heildose, resp. eine einfache Heildose ist in 0,1 ccm. enthalten. Ein millionstel Gramm Eiweiss kann also durch Heilung eines durch sicher tödtliche Diphtherietoxindose inficirten Meerschweins physiologisch nachgewiesen werden. Durch chemische Reagentien ist dies nicht möglich.

Von ähnlichen, wie den oben auseinandergesetzten, Anschauungen ausgehend haben wir eine Untersuchung des pankreatischen Saftes unternommen. Wir können schon jetzt mittheilen, dass aus dem klaren, nach Pawlow's Methode gewonnenen Saft wir in den Alkoholätherextracten Lecithin nachgewiesen haben. Ob es uns gelingen wird, die verschiedenen pankreatischen Enzyme getrennt zu isoliren, oder ob hier analoge Verhältnisse wie beim Magensaft sich herausstellen werden, das ist die Hauptaufgabe, deren Lösung wir anstreben.

---

# Ueber die Stickstoffausscheidung nach Leberextirpation.

Von

Dr. S. Lang, Karlsbad.

Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Litteratur in Böhmen.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 44.)

(Der Redaction zugegangen am 9. März 1901.)

---

## I.

Die grosse Bedeutung der Leber für den Stickstoffhaushalt des thierischen Organismus steht im auffallenden Gegensatze zu den spärlichen sicheren Kenntnissen, die wir über die Zwischenprodukte bei gestörter oder ausgeschalteter Leberfunction besitzen. Diese Lücke erklärt sich zum Theile aus den grossen Schwierigkeiten der Leberausschaltung, die beim Säugethier fast unüberwindlich sind, zum Theile aus dem Mangel einer geeigneten Methodik, die einen Einblick in die quantitative Zusammensetzung der stickstoffhaltigen Bestandtheile des Harnes gewährte.

Nachdem von Pfaundler<sup>1)</sup> eine brauchbare Methode zur Bestimmung der Stickstoffvertheilung im Harn ausgearbeitet worden war, schien es wünschenswerth, die Verhältnisse der Stickstoffausscheidung im Harn der Vögel, bei denen eine einwandfreie völlige Leberausschaltung möglich ist, zu untersuchen.

Die wichtigen und für die Lehre von der Harnsäurebildung im Vogelorganismus grundlegenden Versuche Minkowski's<sup>2)</sup> hatten bereits dargethan, dass bei entleberten Gänsen eine auffallende Verschiebung der stickstoffhaltigen Bestandtheile des Harnes eintritt. Die bei normalen Gänsen 60—70% des Gesamtstickstoffs betragende Harnsäureausscheidung ver-

---

1) Pfaundler, Ueber ein Verfahren zur Bestimmung des Amidosäurenstickstoffs im Harn. Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 75.

2) Minkowski, Ueber den Einfluss der Leberextirpation auf den Stoffwechsel. Archiv f. exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. XXI.

schwindet zum grössten Theile, dagegen werden 50—60% des Gesamtstickstoffs als Ammoniak ausgeschieden. Die daneben in Form von Harnsäure ausgeschiedene Stickstoffmenge beträgt nur 3—6% des Gesamtstickstoffs und entstammt, wie die Versuche von v. Mach<sup>1)</sup> zeigten, der durch die Leberausschaltung nicht behinderten Oxydation von Purinkörpern. Es liess sich erwarten, mit Hülfe der erwähnten Methode etwa neben der Ammoniakausscheidung stattfindende Veränderungen in der Stickstoffvertheilung, die immerhin noch 50—40% des Gesamtstickstoffes betreffen konnten, aufzufinden, sowie über das Verhalten eingeführter stickstoffhaltiger Stoffe im Organismus nach der Leberausschaltung und ihre im Harn erscheinenden Umwandlungsprodukte eine übersichtliche Orientirung zu gewinnen.

## II.

Was die Ausführung der Methode betrifft, so schien es zunächst hinreichend, das Pfaundler'sche Verfahren in folgender Vereinfachung durchzuführen.

1. Bestimmung des durch Magnesia austreibbaren Stickstoffs.
2. Bestimmung des Stickstoffs von Phosphorwolframsäureniederschlag und -Filtrat in der Lösung des nach der Magnesiadestillation verbleibenden Rückstandes.

Es wurde eine abgemessene Menge Harn mit N-freier Magnesia im Ueberschuss versetzt und destillirt. Der Rückstand wurde in Salzsäure (spec. Gew. 1,124) gelöst und mit Phosphorwolframsäure (nach Pfaundler's Vorschrift bereitet) gefällt. Der Niederschlag wurde meist nach 24stündigem Stehen abfiltrirt, mit verdünnter Phosphorwolframsäure gewaschen und Niederschlag, sowie das mit der Waschflüssigkeit vereinigte Filtrat zur Stickstoffbestimmung verwendet. Ausserdem wurde eine andere Harnportion direkt mit Phosphorwolframsäure gefällt und im Niederschlage sowie im Filtrate (vereinigt mit der Waschflüssigkeit) der Stickstoff bestimmt. Auf diese Weise war innerhalb gewisser Grenzen eine Kontrolle der ersten Bestimmungen möglich, indem der Stickstoff des Phosphorwolframsäureniederschlags der Summe aus dem Ammoniakstickstoff und dem nach der Magnesiadestillation durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoff entsprechen musste, während der Stickstoffgehalt des Filtrates mit dem des Filtrates der ersten Phosphorwolframsäure-

---

<sup>1)</sup> v. Mach, Ueber die Bildung der Harnsäure aus dem Hypoxanthin. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak., Bd. XXIV, S. 389.

fällung übereinstimmen sollte. Die Uebereinstimmung konnte keine absolute sein, da bei der Magnesiadestillation auch ein allerdings geringer Antheil des Stickstoffes aus Harnstoff und vielleicht auch anderen amidartigen Verbindungen in Freiheit gesetzt wird.

Bei der Ausfällung mit Phosphorwolframsäure wurde darauf geachtet, einen grösseren Ueberschuss zu vermeiden; es wurde in jedem einzelnen Falle durch vorsichtigen allmählichen Zusatz der Säure die nöthige Menge ermittelt, die je nach der Concentration des Harnes schwankte.

Auf diese Weise wurde der ausgeschiedene Stickstoff in drei Gruppen gesondert:

Fraction I. Der durch Magnesia austreibbare Stickstoff, entsprechend dem Stickstoff des Ammoniaks und einem kleinen Bruchtheile aus Harnstoff und eventuell vorhandenen Säureamiden abgespaltenen Stickstoffs.

Fraction II. Der durch Phosphorwolframsäure nach Entfernung der Fraction I fällbare Stickstoff, entsprechend dem Stickstoff der Harnsäure, der Purinkörper, eventuell der Diaminosäuren.

Fraction III. Der durch Phosphorwolframsäure nach Entfernung der Harnsäurebasenfraction nicht fällbare Stickstoff, entsprechend den Amidosäuren, dem grössten Theile des Harnstoffs, dem Kreatin.<sup>1)</sup>

### III.

Nothwendige Voraussetzung für die Beurtheilung der nach Leberausschaltung eintretenden Verhältnisse war die Kenntniss der Stickstoffvertheilung im normalen Gänseharn. Es wurden daher zunächst einige Normalversuche angestellt. Um den Harn ohne Beimischung von Koth zu erhalten, wurde normalen Thieren, die constant in allen Versuchen mit Hafer gefüttert wurden, der Mastdarm oberhalb der Kloake unterbunden, der

---

<sup>1)</sup> Der Uebersichtlichkeit halber soll im Folgenden der Stickstoff der Fraction I als Magnesia-Stickstoff, der Stickstoff der Fraction II als Harnsäurebasenstickstoff, der Stickstoff der Fraction III als Monamidosäurenstickstoff bezeichnet werden, ohne durch diese Ausdrücke die Bestandtheile der einzelnen Fractionen im Einzelnen charakterisiren zu wollen.

Harn unter Toluol aufgefangen. Die Entnahme der einzelnen Portionen für die Bestimmungen stiess insofern auf Schwierigkeiten, als der entleerte Harn reichlich Harnsäurekügelchen, in eine schleimige Substanz eingebettet, enthält, die in der Flüssigkeit rasch zu Boden sinken. Eindampfen des Harnes zu einem gleichmässigen Brei konnte Veränderungen der stickstoffhaltigen Substanzen herbeiführen. Es wurde deshalb eine möglichst gleichmässige Vertheilung durch Schütteln zu erzielen versucht. In Versuch III wurde der Harn zentrifugirt, die Flüssigkeit über dem Bodensatze abgegossen, das Sediment wiederholt mit destillirtem Wasser gewaschen und wieder zentrifugirt. Es wurden dann von der mit den Waschwässern vereinten Harnflüssigkeit, sowie von dem Sedimente gewogene Mengen zu gesonderten Bestimmungen genommen und auf den Gesammtharn umgerechnet. Ich lasse die Resultate in tabellarischer Form folgen:

	Ver- such I	Ver- such II	Ver- such III
Gesammtstickstoff . . . . .	0,3423 ‰	0,2716 ‰	0,3487 ‰
Magnesiastickstoff . . . . .	0,0721 ‰	0,0658 ‰	0,09901 ‰
In Procenten des Gesammtstickstoffs. .	21,07 ‰	24,0 ‰	28 ‰
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	0,2275 ‰	0,1643 ‰	0,1853 ‰
In Procenten des Gesammtstickstoffs. .	66,46 ‰	60,5 ‰	53,1 ‰
Monamidosäurenstickstoff . . . . .	0,0427 ‰	0,0415 ‰	0,644 ‰
In Procenten des Gesammtstickstoffs. .	12,5 ‰	15,5 ‰	18,6 ‰
P-W-Nied.-N <sup>1)</sup> , direkt im Harn . . . .	0,2996 ‰		0,2843 ‰
In Procenten des Gesammtstickstoffs. .	87,5 ‰		*) 81 ‰
P-W-Filtr.-N, direkt im Harn . . . .	*) 0,0429 ‰		
In Procenten des Gesammtstickstoffs. .	13,3 ‰		

1) P-W-Nied.-N bedeute den Stickstoff des Phosphorwolframsäure-niederschlags;

P-W-Filtr.-N bedeute den des Phosphorwolframsäurefiltrats.

\*) Die mit \*) bezeichneten Zahlen sind durch indirekte Bestimmung gefunden.

den in der Litteratur vorliegenden Angaben über die Zusammensetzung des normalen Vogelharnes (Meissner,<sup>1)</sup> v. Knierim,<sup>2)</sup> Meyer,<sup>3)</sup> Minkowski<sup>4)</sup>). Diesen zufolge erscheinen darin 60—70% des Gesamtstickstoffes in Form von Harnsäure, 9—18% in Form von Ammoniak, 2—6% in Form von Harnstoff. Die etwas höheren Ammoniakwerthe in meinen Versuchen erklären sich vielleicht daraus, dass bei der Magnesiadestillation aus dem Schleimkörper<sup>5)</sup> des normalen Gänseharnes eine geringe Menge Amidstickstoff abgespalten wird. Die Werthe für den Stickstoff der Harnsäurebasenfraction decken sich wohl ganz mit dem Stickstoff der Purinkörper; die Werthe der Monamidosäurefraction bewegen sich in ziemlich engen Grenzen, von 12—18% des Gesamtstickstoffes.

#### IV.

Nachdem so die Stickstoffvertheilung des normalen Harnes festgestellt war, konnten die Untersuchungen des nach Leberextirpation entleerten Harnes ausgeführt werden. Die Leberextirpation wurde nach Minkowski's Methode ausgeführt, mit der kleinen auch von Kausch<sup>6)</sup> als zweckmässig erkannten Modification, erst das ligament. suspensor., dann die vom Magen her in den linken Leberlappen einmündenden Gefässe und dann erst die Leberpforte zu unterbinden. Vor jeder Operation wurde das Rectum unterbunden, nach beendeter Operation die Kloake ausgespült. Meist wurden die ersten,

---

1) Meissner, Zeitschrift für rationelle Medicin, 3. Folge, Bd. 31.

2) v. Knierim, Zeitschrift für Biologie, Bd. 13, S. 36, 1877.

3) Meyer und Jaffé, Ber. d. deutschen chem. Gesellsch., Bd. 10.

4) Minkowski, l. c.

5) Diese Vermuthung ist deshalb naheliegend, weil die durch Centrifugiren erhaltenen Sedimente des normalen Gänseharnes, welche nur aus Harnsäure und Schleim bestehen, bei der Magnesiadestillation etwas Stickstoff abspalten. 0,927 g eines solchen Sedimentes lieferten z. B. 0,00518 g Magnesiastickstoff.

6) Kausch, Archiv f. exper. Pathologie und Pharmakologie. Bd. 39, S. 219.

harnsäurereicher sind, nicht mit verarbeitet.

#### Versuch IV.

Operation beendet um 12 Uhr; das Thier lebt noch Abends um 9 Uhr und wird am nächsten Morgen todt gefunden.

	In 100 ccm. Harn	In Procenten des Gesammt-N
Gesammtstickstoff . . . . .	0,2639 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,182 %	68,9 %
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	0,014 %	5,3 %
Monamidosäurenstickstoff . . . . .	*) 0,0679 %	25,8 %
P-W.-Nied.-N direkt im Harn . . .	0,201 %	77,9 %
P-W.-Filtr.-N direkt im Harn . . .	*) 0,063 %	23,0 %
N(NH <sub>3</sub> ) nach Schlösing . . . . .	0,1786 %	67,67 %

Um ein für alle Mal die Frage zu entscheiden, ob nach der Leberausschaltung eine Veränderung der Harnstoffausscheidung eintritt, welche den Werth der Amidosäurenfraction beeinflussen könnte, wurde in diesem Falle auch eine Harnstoffbestimmung ausgeführt. In 20 ccm. Harn wurde das Ammoniak durch Kochen mit Magnesia verjagt, der Rückstand in Salzsäure gelöst und mit Phosphorwolframsäure gefällt, das Filtrat durch 12 Stunden mit Phosphorsäure auf 150° erhitzt, der Rückstand in Wasser aufgenommen und einer Magnesiadestillation unterworfen; es fanden sich 0,00224 g Stickstoff = 0,112%, entsprechend 4,3% des Gesammt-N. Eine Vermehrung des Harnstoffs war somit nicht eingetreten, ein Resultat, das mit Minkowski's Beobachtungen übereinstimmt.

#### Versuch V.

Operation beendet um 11 1/2 Uhr. Tod um 3 1/2 Uhr. Trotzdem dieses Thier nur 4 Stunden gelebt hatte, wurde der Harn doch verarbeitet, um ein Bild der Uebergangsverhältnisse zu erhalten.



	In 100 ccm. Harn	Gesamt-N
Gesamtstickstoff . . . . .	0,2184 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,0847 %	38,6 %
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	*) 0,0553 %	25,3 %
Monamidosäurenstickstoff . . . . .	*) 0,077 %	36,1 %
P-W.-Nied.-N direkt im Harn . . .	0,140 %	63,9 %
P-W.-Filtr.-N direkt im Harn . . .	0,077 %	36,1 %

Die Menge des Ammoniaks zeigt sich wohl gegenüber der Norm vermehrt, jedoch noch nicht zur vollen Höhe gelangt; dementsprechend weist auch der Phosphorwolframsäureniederschlag-N eine relativ hohe Zahl auf, die wohl durch die Harnsäure bedingt ist; die Menge des Stickstoffs der Monamidosäurenfraction ist sowohl gegen die Norm, wie gegen die Zahlen bei voller Höhe der nach Leberausschaltung eintretenden Veränderungen vermehrt; diese Thatsache soll im Zusammenhange mit späteren Versuchen gedeutet werden, durch welche dieselbe eine Erklärung erfährt.

#### Versuch VI.

Operation beendet um 11 1/2 Uhr; das Thier lebt noch Abends um 9 Uhr. Morgens todt gefunden. Der Harn wurde in getrennten Portionen aufgefangen und verarbeitet, um einen Einblick in den stufenweisen Verlauf der Stickstoffverschiebung zu erlangen; denn wie aus Minkowski's Versuchen hervorgeht, zeigt sich innerhalb der geringen Harnsäureausscheidung eine allmähliche Abnahme in den späteren Stunden nach der Leberexstirpation, bis ein constantes niedriges Niveau erreicht ist. Die erste Harnportion wurde nicht verarbeitet, die zweite war von 4—7 Uhr entleert worden, die dritte war der Kloake des todtten Thieres entnommen. Der Harn reagirte in diesem Versuche ausnahmsweise alkalisch und wurde deshalb, um Ammoniakverluste zu verhüten, in Salzsäure (normal) aufgefangen.

	Harnportion II		Harnportion III	
	In 100 ccm.	In Procenten des Gesammt-N	In 100 ccm.	In Procenten des Gesammt-N.
Gesammtstickstoff . . . . .	0,3528 %	—	0,3887 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,2485 %	70,4 %	0,2597 %	66,8 %
Harnsäurebasenstickstoff . .	0,01701 %	4,82 %	0,0392 %	10,08 %
Monamidosäurenstickstoff . .	*)0,0872 %	24,78 %	0,0973 %	25,04 %
P-W.-Nied.-N direkt im Harn	0,2716 %	76,9 %	0,2825 %	72,05 %
P-W.-Filtr.-N direkt im Harn	—	—	0,107 %	27,5 %

### Versuch VII.

Operation beendet um 11<sup>1/2</sup> Uhr; das Thier lebt noch um 10 Uhr. Der Harn wurde wieder in einzelnen Portionen untersucht, mit Ausschluss der zuerst entleerten. Die II. Portion war von 3<sup>1/2</sup>—4 Uhr, die III. von 4—7 Uhr entleert worden, die IV. in den letzten Lebensstunden, vereinigt mit dem der Blase des todtten Thieres entnommenen Harne.

### Harnportion II.

	Gesammt- stickstoff	Magnesia- stickstoff	Harnsäure- basen- stickstoff	Monamido- säuren- stickstoff
In 100 ccm. Harn . . . .	0,280 % <sup>1)</sup>	0,2044 %	0,0238 %	*)0,0994 %
In Proc. des Gesammt-N .	—	73 %	8,5 %	18,5 %

### Harnportion III.

In 100 ccm. Harn . . . .	0,2478 %	0,1624 % N(NH <sub>3</sub> ) Schlössing: 0,1568 %	0,014 %	*)0,0714 %
In Proc. des Gesammt-N .	—	65,53 % Schlössing: 63,27 %	5,52 %	28,95 %

1) Diese Zahl stellt eine Minimalzahl dar, weil die Destillation (wegen Springens des Kolbens) nicht zu Ende geführt wurde; die Uebereinstimmung mit den anderen Werthen lässt jedoch den Ammoniakverlust, wenn überhaupt ein solcher vorlag, recht klein erscheinen.

	Gesamtstickstoff	Magnesiastickstoff	Harnsäurebasenstickstoff	Monamidosäurenstickstoff
In 100 ccm. Harn . . . .	0,2310 %	0,1547 %	0,0203 %	*)0,056 %
In Proc. des Gesamt-N .	—	66,97 %	8,78 %	24,24 %

Ueberblickt man die gefundenen Resultate, so ergibt sich als auffallendstes Ergebniss die starke Vermehrung des Magnesiastickstoffes, entsprechend der bedeutenden Ammoniakzunahme, und eine Verminderung des im Phosphorwolframsäureniederschlage erhaltenen Stickstoffes, entsprechend der erheblichen Abnahme der Harnsäure. Die Zahlen stimmen sehr gut mit denen Minkowski's überein, nach welchem 50—60% des Gesamtstickstoffs als Ammoniak ausgeschieden werden, während die Harnsäure auf 3—6% des Gesamt-N sinkt. Wie aus den Zahlen, die bei Untersuchung der Einzelportionen erhalten wurden, hervorgeht, scheint in den späteren Lebensstunden nach der Entleerung eine leichte Zunahme des durch Phosphorwolframsäure fällbaren Stickstoffs stattzufinden; so stieg derselbe in Versuch VI von 4,8 auf 10%, in Versuch VII von 5,5 auf 8,7%. Da eine Steigerung der Harnsäureausscheidung sicher nicht stattfindet, muss die Zunahme durch andere Stoffe bedingt sein. Auch im Phosphorwolframsäurefiltrate macht sich eine geringe Steigerung gegen die Norm bemerkbar. Diese Zunahmen des Stickstoffs sind jedoch zu klein, um bestimmte Schlüsse daran zu knüpfen. Es wäre denkbar, dass diese Veränderung durch Ausscheidung von Spaltungsprodukten der Eiweisskörper, die Vermehrung der Harnsäurebasenfraction durch Auftreten von Diamidosäuren, die der Monamidosäurenfraction durch Auftreten von Amidosäuren bewirkt würde. Darauf abzielende Isolirungsversuche haben der geringen zu erhaltenden Substanzmengen wegen zu keinem Resultate geführt. Eine Klarlegung dieser Verhältnisse liess sich nur dann erhoffen, wenn es gelang, grössere Ausschläge in den einzelnen Fractionen zu erzielen.

V.

Zunächst erschien es geboten, den Einfluss zugeführter Amidosäuren auf die Stickstoffvertheilung (nach der Entleberung) zu untersuchen. Im normalen Vogelorganismus werden dieselben nach v. Knierim<sup>1)</sup> in Harnsäure übergeführt. Versuche Minkowski's mit Fütterung von Glycocoll, Leucin und Asparagin an entlebte Gänse hatten bereits ergeben, dass eine Vermehrung des Stickstoffs, bedingt durch eine Zunahme des Ammoniaks, erfolgt, und dass die Harnsäureausscheidung völlig unbeeinflusst bleibt.

Versuch VIII.

Operation beendet 11<sup>1</sup>/<sub>4</sub> Uhr. Das Thier erhält unmittelbar nach der Operation 1 g Glycocoll durch die Schlundsonde und 1<sup>1</sup>/<sub>2</sub> g Glycocoll subcutan; es lebt noch um 10 Uhr Abends. Der Harn wurde in zwei Portionen aufgefangen und zwar Portion I bis 5 Uhr, Portion II von 5 Uhr ab.

I. Harnportion.

	Gesamtstickstoff	Magnesiastickstoff	Harnsäurebasenstickstoff	Monamidosäurenstickstoff	P.W. Nied.-N direkt im Harn
In 100 ccm. Harn . .	0,3922 %	0,2632 %	0,0245 %	0,1045 %	0,3276 %
In % des Gesamt-N	—	67,12 %	6,24 %	26,6 %	83,5 %

II. Harnportion.

In 100 ccm. Harn . .	0,4242 %	0,2730 % (Schlössing: 0,310 %)	0,0147 %	0,1365 %	0,310 %
In % des Gesamt-N	—	64,3 % (Schlössing: 78 %)	3,46 %	32,24 %	73,0 %

<sup>1)</sup> v. Knierim l. c.

<sup>2)</sup> Ausnahmsweise sind in diesem Versuche die Ammoniakwerthe höher als die des Magnesiastickstoffes, ein Verhalten, das in keinem der Versuche beobachtet wurde und auf die Anwesenheit einer nach Glycocollfütterung auftretenden, dem Löwi'schen Körper ähnlichen Substanz hindeutet. (Vergl. diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 514.)

früheren Versuche nicht erkennen; der Zunahme des Gesamtstickstoffs entspricht eine gleiche des Ammoniaks, so dass die procentische Vertheilung ungestört bleibt; zugleich geht aus den gleich niedrig gebliebenen Werthen der Harnsäurebasenfraction hervor, dass eine Vermehrung der Harnsäure nicht erfolgt.

Ein ähnliches Resultat lieferte der folgende Versuch.

### Versuch IX.

Operation beendet 11 $\frac{1}{2}$  Uhr; unmittelbar nachher erhält das Thier asparaginsaures Natrium, und zwar 1 g subcutan und 1 g per os; es lebt noch um 9 Uhr Abends.

	In 100 ccm. Harn	In Procenten des Gesamt-N
Gesamtstickstoff . . . . .	0,7012 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,3956 %	56,4 %
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	0,01087 %	15,5 %
Monamidosäurenstickstoff . . . . .	*) 0,2948 %	28,1 %

Der etwas höhere Werth der Harnsäurebasenfraction ist in diesem Versuche wohl durch eine etwas grössere Harnsäuremenge zu erklären; die Section des Thieres hatte ergeben, dass ein grösseres Leberstückchen, dicht der vena cava angelagert, zurückgeblieben war, und obwohl von nekrotischen Stellen durchsetzt, nicht ganz functionsunfähig gewesen sein mochte. Zu einer Harnsäurebestimmung reichte der spärlich entleerte, sehr concentrirte Harn nicht aus. Sonst stimmen die Zahlen sehr gut mit den früheren Versuchen überein. Für die niedriger als in anderen Versuchen ausgefallene Ammoniakmenge wäre auch eine andere Erklärung heranzuziehen.

Ein anderer mit Fütterung von Asparagin angestellter Versuch missglückte, indem das Thier zwei Stunden nach der Operation starb, ohne Harn entleert zu haben.

Jedenfalls geht aus diesen Versuchen hervor, dass ein-

geführte Amidosäuren die Stickstoffvertheilung nicht beeinflussen; sie verhalten sich also in dem der Leber beraubten Organismus genau so, wie die aus dem Abbau des Eiweisses hervorgegangenen Amidosäuren, d. h. es erfolgt eine Abspaltung von Ammoniak, welches im Harne vermehrt erscheint. Ob dieser Vorgang im normalen Vogelorganismus eine hervorragende Rolle bei der Harnsäurebildung spielt, in der Weise, dass die aus dem Eiweiss entstandenen Amidosäuren stets unter Ammoniakabspaltung zerfallen und erst dieses abgespaltene Ammoniak synthetisch in der Leber zur Harnsäurebildung verworther wird, ist nicht mit Sicherheit zu entscheiden; das Resultat der nachfolgenden Versuche lässt jedenfalls Zweifel an dieser Auffassung berechtigt erscheinen.

## VI.

Auffallendere Unterschiede in der Stickstoffvertheilung waren zu erwarten, wenn es gelang, auf Kosten der Ammoniakausscheidung anderen stickstoffhaltigen Substanzen einen breiteren Spielraum zu gewähren.

Da die reichliche Ausscheidung einer Säure (Milchsäure) durch Minkowski erwiesen war, lag der Gedanke nahe, ob die vermehrte Ausscheidung von Ammoniak nicht die Bedeutung einer Säureneutralisation besitze und durch Alkalidarreichung unterdrückt werden könne.

Minkowski macht in seiner Abhandlung «Die Störungen der Leberfunction» (Lubarsch-Ostertag) in summarischer Weise Mittheilung über das Ergebniss solcher von R. Engelmann ausgeführter Versuche,<sup>1)</sup> nach welchen sich die Am-

---

1) Herr Professor Minkowski hatte die grosse Güte, mir das Resultat dieser auf seine Veranlassung ausgeführten und nicht publicirten Versuche näher bekannt zu geben. Es liess sich durch Alkalidarreichung ein bedeutendes Absinken des Ammoniaks erreichen, während ein Ansteigen der Harnsäureausscheidung nicht beobachtet wurde; in einem Falle fehlten 70 % des Stickstoffs, die nicht als Ammoniak, Harnsäure oder Harnstoff vorhanden waren. Ebenso verdanke ich Herrn Professor Minkowski die werthvolle Angabe, dass es nicht gelingt, den Thieren nach der Operation genügende Mengen Alkali beizubringen, dass man hingegen dem Organismus einen genügenden Alkalivorrath zuführen könne, wenn man die Thiere einige Tage vorher mit Alkalicarbonat füttert.

trächtlich herabdrücken lasse, ohne dass eine Steigerung der Harnsäureausscheidung eintritt, und schliesst daraus, dass die Störung der Harnsäurebildung nach Ausfall der Leberfunction bei den Vögeln nicht allein auf der Ammoniakentziehung durch die Milchsäure beruhe.

Ich lasse die Resultate einiger Versuche folgen:

### Versuch X.

Eine Gans erhält durch vier Tage je 5 g Natriumbicarbonat durch die Schlundsonde eingegossen. Am Tage der Operation vor derselben  $2\frac{1}{2}$  g, nach derselben wieder  $2\frac{1}{2}$  g  $\text{NaHCO}_3$ . Operation beendet  $11\frac{1}{2}$  Uhr; das Thier lebt noch spät am Abend. Morgens todt gefunden.

	In 100 ccm. Harn	In Procenten des Gesamt-N
Gesamtstickstoff . . . . .	0,2352 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,1136 %	48,3 %
$\text{N}(\text{NH}_3)$ nach Schlösing . . . . .	0,098 %	41,6 %
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	0,0487 %	20,73 %
Monamidosaurenstickstoff . . . . .	0,0728 %	30,96 %
Harnsäurestickstoff <sup>1)</sup> . . . . .	0,0132 %	5,6 %

1) Die Harnsäurebestimmung wurde nach Hopkins durch Sättigen mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  und nachheriges Wägen der durch  $\text{HCl}$  aus dem Ammonurat frei gemachten Harnsäure bestimmt. Da durch die Sättigung mit Salz auch Spuren eines Eiweisskörpers sowie Gallenfarbstoff mitgefällt wurden, war es nöthig, die heisse Lösung des Ammonurats noch einmal zu filtriren, wobei der Eiweissniederschlag sowie der grösste Theil des Gallenfarbstoffs zurückblieb. Der Rest des letzteren lässt sich nach Abscheidung der freien Harnsäure leicht durch Alkohol entfernen. Wie gross der Fehler bei Ausserachtlassung dieser Angaben werden kann, lehrt folgender Vorversuch: Eine gemessene Harnmenge wurde mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gesättigt, filtrirt (nach vierstündigem Stehen), der Niederschlag mit 20 %  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gewaschen, dann in 2 % iger N-freier Natronlauge gelöst und das Ammoniak in der Kälte (durch mehrtägiges Stehen der Flüssigkeit über Säure) vertrieben (Erhitzen wurde vermieden, um den Stickstoff des eventuell mitgefällten Eiweisses nicht zu verjagen), hierauf die ammoniak-

### Versuch XI.

Eine Gans erhält 2 Tage hindurch je 5 g  $\text{NaHCO}_3$ . Vor der Operation 2 g, nach der Operation 2 g. Operation beendet um 12 $\frac{1}{2}$  Uhr.

Um 3 $\frac{1}{2}$  Uhr werden 3 g  $\text{NaHCO}_3$  eingegossen, die teilweise wieder erbrochen werden.

Um 5 $\frac{1}{2}$  Uhr werden nochmals 2 g gereicht. Erst der nach 5 $\frac{1}{2}$  Uhr entleerte Harn reagirt alkalisch und wird deshalb in vorgelegter Säure aufgefangen.

Tod unter Krämpfen um 7 $\frac{1}{2}$  Uhr.

	In 100 ccm. Harn	In Procenten des Gesamt-N
Gesamtstickstoff . . . . .	0,1008 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,0420 %	41,6 %
$\text{N}(\text{NH}_3)$ nach Schlösing . . . . .	0,0364 %	36,15 %
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	0,0238 %	23,6 %
Monamidosaurenstickstoff . . . . .	0,03430 %	34,0 %
P-W-Nied.-N, direkt im Harn . . . . .	0,0630 %	62,5 %
P-W-Filtr.-N, direkt im Harn . . . . .	0,0392 %	38,8 %

### Versuch XII.

Eine Gans erhält durch 4 Tage je 5 g  $\text{NaHCO}_3$  per os. Operation am 4. Tage der Fütterung, beendet um 11 $\frac{1}{2}$  Uhr. Tod um 1 $\frac{1}{2}$  Uhr. Der reichlich entleerte Harn war sehr verdünnt. Trotz der kurzen Lebensdauer des Thieres erscheinen die gefundenen Resultate gut verwerthbar.

freie Flüssigkeit einer Stickstoffbestimmung unterworfen. Es fanden sich so 20 % des Gesamtstickstoffs, während der gesammte P-W-Nied.-N nach der Mg-Destillation nur 17 % betrug und nur zum geringsten Theil aus Harnsäure bestand.

In einem anderen Versuche, in welchem die Lösung des Ammonurats mit Lauge gekocht worden war, betrug der gefundene Stickstoff immer noch 13 % des Gesamtstickstoffs, während der Harnsäure nur 5,6 % entsprachen.



	in 100 ccm. Harn	Gesamt-N
Gesamtstickstoff . . . . .	0,066 %	—
Magnesiastickstoff . . . . .	0,004 %	6,0 %
Harnsäurebasenstickstoff . . . . .	0,0115 %	17,42 %
Monamidosäurenstickstoff . . . . .	*) 0,0505 %	76,52 %
P-W-Nied.-N, direkt im Harn . . . .	0,016 %	24,25 %
P-W-Filtr.-N, direkt im Harn . . . .	0,0500 %	75,75 %

Die niedrige Zahl des P-W-Nied.-N kann als Beweis dafür angesehen werden, dass eine erhebliche Harnsäureproduktion nicht stattgefunden hatte. Es war daher (nach Analogie der früheren Versuche) eine beträchtliche Vermehrung der Ammoniakmenge zu gewärtigen, welche jedoch unter dem Einfluss des Alkalis ausblieb.

### Versuch XIII.

Eine Gans erhält durch 3 Tage je 4 g  $\text{NaHCO}_3$  (in 2 Dosen täglich). Vor der Operation 2 g. Operation beendet um 11 Uhr. Da in den vorhergehenden Versuchen die vorherige Beibringung des Alkalis nicht zu genügen schien, wurden nach der Operation noch einzelne kleine Mengen in grösseren Zwischenräumen dargereicht. Dieses Verfahren empfahl sich auch im Hinblick auf die Erfahrung, dass einige Thiere, denen grössere Mengen (5—6 g) nach der Operation gereicht wurden, rasch unter Krämpfen zu Grunde gingen.

Um 2 Uhr werden 3 g  $\text{NaHCO}_3$  eingegossen.

Um 5 $\frac{1}{4}$  „ „ 2 g  $\text{NaHCO}_3$  „

Um 7 „ „ 2 g  $\text{NaHCO}_3$  „

Der bis kurz vor 7 Uhr entleerte Harn reagierte immer noch sauer. Er wurde daher getrennt von der später entleerten, alkalisch reagirenden Harnportion verarbeitet.

Das Thier lebte noch um 8 Uhr Abends. Morgens todt gefunden.

### Harnportion I.

	Gesammt-N	Magnesia-N	N(NH <sub>3</sub> ) nach Schlössing	Harnsäure- basen- stickstoff	Monamido- säuren- stickstoff
In 100 ccm. Harn	0,1498 ‰	0,0847 ‰	—	0,01960 ‰	*) 0,0455 ‰
In ‰ d. Gesammt-N	—	56,5 ‰	—	13,08 ‰	30,42 ‰

### Harnportion II.

In 100 ccm. Harn	0,1512 ‰	0,0532 ‰	0,050 ‰	0,03290 ‰	*) 0,0651 ‰
In ‰ d. Gesammt-N	—	35,18 ‰	30,2 ‰	21,76 ‰	43,06 ‰

Harnsäurestickstoff in Portion II 8,3 ‰ des Gesammtstickstoffs.

Um einen Vergleich mit den früheren Versuchen zu erleichtern, stelle ich in folgender Tabelle (Seite 336) die Resultate (in Procenten des Gesammtstickstoffs ausgedrückt) zusammen.

### VI.

Wie aus den Werthen des Magnesiastickstoffs<sup>1)</sup> ersichtlich, gelang es in der That, durch Zufuhr von Natriumbicarbonat die Ammoniakausscheidung beträchtlich herabzusetzen. Der durchschnittlich 65 ‰ des Gesammt-N betragende Stickstoff des Ammoniaks sinkt bis auf 32 ‰, also um die Hälfte; die in einem Versuche beobachtete Herabsetzung auf 6 ‰ fand bei einem Thiere statt, das nur zwei Stunden gelebt hatte und bei welchem die Ammoniakausscheidung wohl noch nicht ihre maximale Höhe erreicht hatte, wie aus dem ähnlichen Versuche V zu ersehen ist, der ebenfalls ein Thier von kurzer Lebensdauer betrifft. Immerhin muss in diesem Versuche (XII) die Ammoniakmenge um mehr als die Hälfte herabgedrückt worden sein, wie bei der Beschreibung des Versuches (S. 333) näher ausgeführt ist. Allerdings bleibt es zweifelhaft, ob die gereichten Alkalimengen, genügende Resorption vorausgesetzt,

1) In allen Alkaliversuchen wurde das Ammoniak auch nach Schlössing bestimmt; die hier erhaltenen Zahlen entsprechen dem wahren Ammoniakwerthe, worauf es bei diesen Versuchen allein ankam.

Art des Versuches	Lebensdauer des Thieres	Magnesia N	N (NH <sub>4</sub> ) Schlössing	Harnsäure- Basen- Stickstoff	Monamido- säuren- Stickstoff	N (Ü)
Versuch IV. Leberexstirpation	Mehr als 10 Stunden	68,9 %	67,67 %	5,3 %	25,8 %	—
Versuch V. Leberexstirpation	4 Stunden	38,6 %	—	25,3 %	36,1 %	—
2. Harnportion		70,4 %	59,53 %	4,82 %	24,78 %	—
Versuch VI.	Mehr als 10 Stunden	66,8 %	—	10,06 %	26,04 %	—
Versuch VII. { 2. , Leberexstir- 3. , pation 4. ,	Mehr als 10 Stunden	73 % 65,58 % 66,97 %	— 63,27 % —	8,5 % 5,52 % 8,78 %	18,5 % 28,95 % 24,24 %	— — —
Versuch VIII. { 1. , Glycocol- 2. ,	Mehr als 11 Stunden	67,12 % 64,3 %	— 73 %	6,24 % 3,46 %	26,6 % 32,24 %	— —
Versuch IX. Fütterung von asparaginsäurem Natrium	Mehr als 10 Stunden	56,4 %	—	15,5 %	28,1 %	—
Versuch X. NaHCO <sub>3</sub>	Mehr als 10 Stunden	48,3 %	41,6 %	20,73 %	30,96 %	5,6 %
Versuch XI. NaHCO <sub>3</sub>	7 Stunden	41,6 %	36,15 %	23,6 %	34,0 %	8,2 %
Versuch XII. NaHCO <sub>3</sub>	2 Stunden	6,0 %	—	17,42 %	76,52 %	—
Versuch XIII. { 1. Harnportion NaHCO <sub>3</sub> 2. ,	9 Stunden	56,5 % 35,18 %	— 30,2 %	13,06 % 21,76 %	30,4 % 43,0 %	— 8,3 %

zur Neutralisation der gebildeten Säure genügen. Denn trotz der tagelang vorhergehenden Darreichung von Natriumbicarbonat sowie der relativ grossen Mengen, die in anderen Versuchen auch nach der Operation gereicht wurden, schlug die saure Reaction des Harnes erst spät in die alkalische um. Die Zahlen des Versuches XIII sind in dieser Richtung lehrreich, weil sie zeigen, wie im Anfange trotz des Alkalis die Ammoniakzahl sich hoch erhält, um erst spät erheblich abzusinken.

Ueberdies kann die alkalische Reaction des Harnes nach Fütterung von Alkali an entlebte Gänse auch nicht als sicherer Beweis dafür gelten, dass dem Organismus genügend Alkali zur Verfügung steht; denn nach der Leberexstirpation fliesst das aus dem Magendarmtracte kommende Blut durch die Vena Jacobsonii direkt (unter Vermittlung einer Vena advehens) in die Nierenvene und es wäre möglich, dass es so zur Abscheidung eines alkalischen Harnes kommt, ehe die Gewebe mit Alkali übersättigt sind. Die Schwierigkeit, im Organismus entstandene Säuren zu sättigen, für welche aus der menschlichen Pathologie das Coma diabeticum ein Beispiel bietet, steht im auffallenden Gegensatze zu der Leichtigkeit, mit der die Entgiftung von aussen zugeführter Säuremengen im Thierversuche gelingt. Jedenfalls zeigt sich in den Alkaliversuchen eine deutliche Verschiebung der Stickstoffvertheilung, die nicht nur den Magnesiastickstoff betrifft; an Stelle des unterdrückten Ammoniaks tritt eine Vermehrung der Phosphorwolframsäurefällung und eine geringe Vermehrung des Monamidosäurenstickstoffs auf.

Da eine Vermehrung der Harnsäure nach Alkalidarreichung nicht eintritt, sind die die Zunahme der Harnsäurebasenfraction bedingenden Körper wohl zur Gruppe der Diamidosäuren (Arginin oder Ornithin) zu rechnen. Dass die aus dem Eiweiss hervorgehenden Amidosäuren im Harn entlebter Thiere nicht ohne Weiteres zur Ausscheidung kommen, scheint darin begründet zu sein, dass der Organismus dieselben bei Anwesenheit grösserer Säuremengen sofort unter Ammoniakabspaltung weiter zersetzt und das abgespaltene Ammoniak zur Neutralisation der Säure verwendet.

halten eingeführter Amidosäuren zu sprechen. Nach Fütterung derselben an entlebte Thiere (Versuch VIII und IX) trat eine Aenderung der Stickstoffvertheilung nicht ein. Die Amidosäuren stellen eben für den der Leberfunction beraubten Vogelorganismus ein Material dar, das er ebensogut als Mittel zur Säureneutralisation benützt, indem er sie unter Ammoniakabspaltung zersetzt, wie die aus dem Eiweisszerfalle im Organismus hervorgehenden.

Ebenso könnten die ganz vereinzelt dastehenden hohen Zahlen der Monamidosäurenfraction in Versuch V und XII auf dem Boden dieser Thatsache eine Erklärung finden. Beiden Versuchen gemeinsam ist die kurze Lebensdauer der Thiere; die Säurebildung scheint zur Zeit des Todes noch keine solche Höhe erreicht zu haben, um alles aus Amidosäuren verfügbare Ammoniak an sich zu reissen; infolge dessen könnten die Amidosäuren unverändert im Harne erscheinen, naturgemäss bei dem mit Alkali gefütterten Thiere in viel grösserem Maassstabe. Ferner ist es nicht unwahrscheinlich, dass die relativ niedrige Ammoniakzahl im Versuche IX, in welchem asparaginsaures Natrium verfüttert wurde, auf die neutralisirende Wirkung des darin enthaltenen Natriums zurückzuführen ist.

Für den durch Alkali nicht unterdrückbaren Antheil des Ammoniaks scheint eine Erklärung nicht unmöglich. Wenn die Vorstellung gerechtfertigt ist, dass der Aufbau der Harnsäure bei den Vögeln, analog wie es für die Harnstoffbildung beim Säugethier wahrscheinlich ist, aus Amidosäuren in Gegenwart von Ammoniak in der Leber stattfindet, würde es nicht befremden, bei ausgeschalteter Leberfunction neben Amidosäuren<sup>1)</sup> (einschl. Diamidosäuren) auch Ammoniak in erheblicher Menge zu finden.

Durch die Zwischenkunft eines zweiten, mit der Leberausschaltung im ursächlichen Zusammenhange stehenden Processes, des Auftretens grösserer Mengen von Milchsäure, ge-

---

1) Ich gebrauche den Ausdruck Amidosäuren hier und im Folgenden in ganz allgemeiner Bedeutung.

langen eben die Amidosäuren nicht als solche zur Ausscheidung, sondern werden unter Ammoniakabgabe gespalten. Nach dieser Auffassung wäre die Ammoniakausscheidung nach der Leberausschaltung auf eine doppelte Quelle zurückzuführen, wie dies auch den Verhältnissen der Stickstoffbindung im Eiweiss entspricht. Auf Grund der bisherigen Untersuchungen (Nasse, Hausmann, Kossel und Kutscher) ist ein Theil des Stickstoffs im Eiweissmolekül in so lockerer Bindung vorhanden, dass er daraus durch Säure und Alkali leicht abgespalten werden kann. Wie eine demnächst zur Publication gelangende Untersuchung von Dr. Mochizuki aus dem hiesigen Institute gelehrt hat, tritt ein Theil des Eiweissstickstoffs (Nasse's und Hausmann's Amidostickstoff) auch bei der Trypsinverdauung in Form von Ammoniak aus. Dass dieser, allerdings relativ kleine Theil, auch im intermediären Stoffwechsel als Ammoniak abgespalten wird und als solches zur Harnsäuresynthese dient, ist naheliegend.

Für den fester gebundenen Stickstoff des Eiweisses, welcher bei Säure- und Trypsinwirkung in Form von Amidoverbindungen und deren Derivaten erhalten wird, ist eine vitale Ueberführung in Ammoniak an die Einwirkung von Fermenten geknüpft, welche die Fähigkeit besitzen, solchen festgebundenen Stickstoff loszulösen. In der That ist nach Loewi's<sup>1)</sup> und Jacoby's<sup>2)</sup> Erfahrungen die Existenz derart wirksamer proteolytischer Fermente nicht mehr zu bezweifeln.

Damit hat die von Minkowski gehegte Vorstellung, dass die Umwandlung von Amidosäuren der Fettreihe im Organismus des Vogels in der Weise von Statten geht, dass zunächst Ammoniak und zwar auch ausserhalb der Leber abgespalten wird, eine gesicherte, auch für den Säugethierorganismus gültige Grundlage erhalten.

Wenn man jedoch in den vorliegenden Versuchen sieht, dass diese Abspaltung von der Grösse der Säurebildung abhängig ist und bei ausreichender Alkalizufuhr zum Theil unter-

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 55.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 152.

Ammoniakabspaltung immer und in ganzem Umfange erfolgt. Eher scheint hier auch einer jener wunderbaren Regulierungsmechanismen vorzuliegen, an denen die Organismen so reich sind und der im gegebenen Falle die Aufgabe hätte, die Grösse der fermentativen Ammoniakabspaltung dem Alkalibedarf des Körpers anzupassen. Dabei macht es den Eindruck, als ob beim Vogel für den Zweck der Neutralisation vor Allem die Monamidosäuren ihren Stickstoff abgäben, da die Vermehrung des Amidosäurenstickstoffs nach Alkalizufuhr vorwiegend in dem durch Phosphorwolframsäure fällbaren Antheil zu Tage tritt.<sup>1)</sup>

Dass die Störung der Harnsäuresynthese durch die Leberausschaltung nicht eine Folgeerscheinung des vermehrten Säureauftretens darstellt, geht ohne Weiteres aus der Thatsache hervor, dass Alkalizufuhr keinen Einfluss auf die Harnsäureausfuhr äussert.

Wenn aber auf Grund der ersten Versuche Minkowski's die Vorstellung kaum abzuweisen war, das an Stelle der Harnsäure auftretende Ammoniumlactat sei die normale Vorstufe der in der Leber entstehenden Harnsäure, so wird man angesichts der Abhängigkeit der Ammoniakausscheidung von der Alkalizufuhr eine erneute Prüfung dieser Verhältnisse wünschenswerth finden.

Ich hoffe, dieser Frage bald auf einem bisher nicht eingeschlagenen Wege näher treten zu können.

---

1) Ein Seitenstück hierzu bildet das Auftreten der Ornithursäure nach Zufuhr von Benzoesäure. Auch in diesem Fall widersteht eine Diamidosäure, das Ornithin, im Vogelorganismus der Zersetzung.

## Ueber ein proteolytisches Enzym in der Milz.

Von

S. G. Hedín und S. Rowland.

---

(Der Redaction zugegangen am 11. März 1901.)

---

Schon mehrmals ist die Milz mit der Darmdigestion in Verbindung gestellt worden und zwar in der Weise, dass dieselbe die Pankreasverdauung verstärken soll. Nach Schiff soll die Milz von der 4. bis 7. Stunde der Magenverdauung einen Stoff enthalten, der, durch das Blut dem Pankreas zugeführt, die Bildung des Trypsins verursacht.<sup>1)</sup> Herzen fand, dass Pankreasinfus, mit Milzinfus versetzt, Fibrin rascher verdaut, als ohne Milzinfus. Diese Wirkung schreibt er einer Substanz zu, die das Zymogen des Pankreas in Trypsin verwandelt.<sup>2)</sup> Der Schiff-Hezen'schen Lehre von der Beeinflussung des Pankreas durch die Milz schliessen sich Gachet und Pachon auf Grund eigener Versuche an,<sup>3)</sup> während Lusanna und Schindeler, sowie auch Ewald<sup>4)</sup> die volle Wirksamkeit des Pankreas von entmilzten Hunden behaupten, was auch in der letzten Zeit von Popelski unter gewissen Bedingungen constatirt wurde.<sup>5)</sup>

---

1) Maly's Jahresber., Bd. 7, S. 320.

2) Pflüger's Archiv, Bd. 30, S. 295 und Bd. 84, S. 126.

3) Arch. de physiol., Bd. 30, S. 363.

4) Maly's Jahresber., Bd. 10, S. 322.

5) Maly's Jahresber., Bd. 29, S. 353.



geholt, zerkleinert, mit Sand vermischt und in einem be-  
deren von S. Rowland construirten Apparate 2—3 Stur-  
lang behandelt wurde, wodurch die Zellen gequetscht und  
Ganze in eine breiähnliche Masse verwandelt wurde. Da  
wurde mit Kieselguhr vermischt und mittelst einer hyd-  
lischen Presse der Milzsaft ausgepresst. Diese Behandlung w  
von S. Rowland ausgeführt, während die chemischen Arbe  
von S. G. Hedin herrühren.

Der Presssaft war von Hämoglobin roth gefärbt und  
Reaction war immer stark sauer. Um zu prüfen, ob der  
möglicher Weise ein eiweissverdauendes Enzym enthält, w  
derselbe zunächst zur Autolyse bei Körpertemperatur in Ge  
wart von Toluol hingestellt. Der durch Gerbsäure nicht  
bare Antheil des Stickstoffes wurde vor und nach der Diges  
ermittelt. Für die Fällung wurde eine 7%ige, mit et  
Essigsäure versetzte Lösung gebraucht, und zwar wurde  
Volum Milzsaft mit dem gleichen Volumen Gerbsäurelösung  
gesetzt, was für vollständige Ausfällung völlig ausreichte. In 5 c  
des Filtrats wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimm

#### Versuch 1 (Rindermilz).

Die Acidität des Milzsaftes entsprach etwa 25 c  
 $^{1/10}$ n-NaOH in 100 ccm. Saft. Der Saft wurde theils c  
irgend einen Zusatz, theils mit Essigsäure (0,25%) dige  
Die Resultate sind aus folgender Tabelle ersichtlich.

Die Ziffern geben die Anzahl Cubikcentimeter  $^{1/10}$ n-Sä  
an, welche dem Stickstoff von 5 ccm. unverdünntem  
entsprechen.

Der ganze Stickstoffgehalt von 5 ccm. Saft entspr  
42,7 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 22 Stunden	Nach 40 Stunden
Ohne Zusatz . . . . .	7,4	7,4	16,4	16
Mit Essigsäure . . . . .	—	30,0	33,8	34

Eine Probe wurde auf dem Wasserbade erhitzt und mit Gerbsäure gefällt. Der nicht fällbare Stickstoff entsprach 7,6 ccm. Säure.

Eine andere Probe wurde erhitzt und 16 Stunden lang mit Essigsäure bei 37° digerirt. Der nicht fällbare Stickstoff entsprach 7,4 ccm. Säure.

### Versuch 2 (Rindermilz).

In diesem Falle wurden verschiedene Proben ohne Zusatz, mit Essigsäure (0,25%), mit Salzsäure (0,1%) und mit Natriumcarbonat (0,37%) digerirt. Der ganze Stickstoffgehalt entsprach für 5 ccm. 35,1 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 22 Stunden	Nach 40 Stunden
Ohne Zusatz . . . . .	7,2	17,4	17,6	19,8
Mit Essigsäure . . . . .	—	26,7	27,8	30,0
Mit HCl . . . . .	—	25,0	27,8	30,2
Mit Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> . . . . .	—	9,6	9,4	10,8

Eine erhitzte und sofort gefällte Probe ergab die Ziffer 7,4; eine erhitzte und mit Essigsäure (0,25%) 16 Stunden lang digerirte Probe ergab die Zahl 7,6.

### Versuch 3 (Rindermilz).

Verschiedene Proben wurden mit Essigsäure (0,25%) und mit Milchsäure (0,25%) digerirt. Die Lösungen wurden theils mit Gerbsäure wie zuvor, theils mit einer Lösung von 40%iger Phosphorwolframsäure und 10%iger Schwefelsäure gefällt. Da die Gerbsäure im Ueberschuss das Pepton nicht fällt, die Phosphorwolframsäure aber ausser dem Eiweiss auch Pepton und möglicher Weise vorhandene Basen fällt, wird der Unterschied zwischen dem Stickstoffgehalt des Phosphorwolframsäurefiltrats und des Gerbsäurefiltrats ein ungefähres Maass von Pepton und Basen repräsentiren. Die Ziffern der Tabellen haben dieselbe Bedeutung wie vorher. Der ganze Stickstoffgehalt entsprach 38,7 ccm. Säure.



	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 110 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	8,4	34,6	34,5
Gefällt mit Phosphorwolframsäure . .	5,4	17,8	20,0

#### Digestion mit Milchsäure.

Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	8,4	34,8	34,5
Gefällt mit Phosphorwolframsäure . .	5,4	17,6	20,4

Eine Probe, digerirt mit Milchsäure 150 Stunden lang, ergab, mit Phosphorwolframsäure gefällt, ganz dasselbe Resultat, wie nach 110 Stunden.

#### Versuch 4 (Rindermilz).

Die Acidität des Saftes entsprach für 100 ccm. 40 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-Lauge.

Für die Fällung wurde in verschiedenen Proben Gerbsäure, Phosphorwolframsäure, sowie in einigen Fällen Sättigung mit Zinksulfat in schwefelsaurer Lösung benutzt. Da nach den Angaben von Baumann und Bömer das Zinksulfat Eiweiss und Albumosen, nicht aber Pepton ausfällt, darf man erwarten, dass die Gerbsäure und das Zinksulfat dieselben Resultate ergeben werden. Die folgenden Ziffern bestätigen dies. Die Digestion wurde in mit wasserfreiem Natriumcarbonat neutralisirter Lösung, in saurer Lösung ohne irgend einen Zusatz, in mit Essigsäure (0,25%) und mit Salzsäure (0,1%) versetzter Lösung vorgenommen.

Der gesammte Stickstoffgehalt entsprach 39,6 ccm. Säure.

#### Neutralisirter Saft.

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 90 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13,9	19,1	20,4
Gefällt mit PWo-Säure . . . . .	6,5	—	10,9

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 90 Stunden
Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13,9	32,8	32,4
Gefällt mit PWO-Säure . . . . .	6,5	—	20,8

## Mit Essigsäure.

Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13,9	33,0	33,5
Gefällt mit PWO-Säure . . . . .	6,5	17,4	18,0
Gefällt mit $\text{ZnSO}_4$ . . . . .	13,9	32,3	—

## Mit Salzsäure.

Gefällt mit Gerbsäure . . . . .	13,9	32,8	33,6
Gefällt mit PWO-Säure . . . . .	6,5	17,4	19,6

Eine Portion wurde auf dem Wasserbade erhitzt, mit Essigsäure wie vorher versetzt, 16 Stunden lang autolysirt und mit Gerbsäure gefällt; 5 ccm. unverdünnter Saft entsprachen 15,2 ccm. Säure. Unter denselben Verhältnissen, nur ohne Aufkochen, wurde die Ziffer 31,4 erhalten.

## Versuch 5 (Rindermilz).

Fällung mit Gerbsäure. Die Digestion wurde in mit Essigsäure (0,25 %) versetzter, in neutralisirter und in alkalischer Lösung (0,2 % Soda) ausgeführt. Der Gesamtgehalt an Stickstoff entsprach für 5 ccm. Saft 30,2 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	11,8	25,6	26,7
Neutral . . . . .	—	14,2	17,5
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . . . . .	—	13,6	15,2

## Versuch 6 (Pferdemilz).

Die Acidität entsprach für 100 ccm. 35 ccm.  $\frac{1}{10}$ n-Lauge.

Die Analysen wurden alle mit Gerbsäure ausgeführt. Der gesammte Stickstoffgehalt entsprach für 5 ccm. Saft 51 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	5,2	30,7	31,8
Ohne Zusatz . . . . .	—	13,6	20,6
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . . . . .	—	8,1	8,2

### Versuch 7 (Schafmilz).

100 ccm. Saft wurden neutralisirt durch etwa 20 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-Lauge. Fällung mit Gerbsäure. Der Stickstoff in 5 ccm. entsprach 29,3 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure (0,25%) . . . . .	6,6	24,8	26,2
Ohne Zusatz . . . . .	—	17,2	22,5
Neutral . . . . .	—	8,2	9,0
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,2%) . . . . .	—	7,7	8,3

Nach Erhitzen auf dem Wasserbade und Fällung mit Gerbsäure wurde in 5 ccm. unverdünnten Saftes Stickstoff, entsprechend 8,9 ccm. Säure, gefunden. Da ohne Erhitzen die Ziffer 6,6 erhalten wurde (siehe die Tabelle), hat offenbar das Erhitzen einen kleinen Antheil des Eiweisses in durch Gerbsäure nicht fällbare Form übergeführt. Nach Erhitzen und Digeriren mit Essigsäure (0,25%), 16 Stunden lang, wurde die Ziffer 9,1 und nach 40 Stunden die Zahl 9,2 erhalten.

### Versuch 8 (Schweinmilz).

Die Reaction des Saftes entsprach für 100 ccm. 14 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-Säure. Fällung mit Gerbsäure. Der Gesamtstickstoff von 5 ccm. Saft entsprach 28,3 ccm. Säure.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure (0,25%) . . . . .	6,4	21,6	23,3
Ohne Zusatz . . . . .	—	13,5	16
Neutral . . . . .	—	9,6	11,4
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,2%) . . . . .	—	7,6	7,6

Auf dem Wasserbade erhitzter Saft ergab sogleich gefällt die Zahl 7,2 und nach Digeriren mit Essigsäure 40 Stunden lang die Ziffer 8,2.

Aus den erwähnten Versuchen geht zur Genüge hervor:

1. Der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff des erhitzten Milzsafts wird während der Digestion mit 0,25%iger Essigsäure bei Körpertemperatur nicht wesentlich geändert (Versuch 1, 2, 4, 7, 8).

2. Der mit Gerbsäure, Phosphorwolframsäure oder Zinksulfat nicht fällbare Antheil des Stickstoffes nimmt während Aufbewahrens des frischen Milzsaftes bei Körpertemperatur in Gegenwart von Toluol zu. Diese Veränderung des Eiweisses ist eine sehr schwache oder bleibt ganz aus in alkalischer, etwas stärker in neutraler und am stärksten in saurer Lösung. Bisweilen ist die Acidität des Presssaftes eine so starke, dass eine zugegebene Säure keinen weiteren Einfluss hat (Versuch 4).

3. Der mit Phosphorwolframsäure nicht fällbare Stickstoff erreicht nicht die Grösse des durch Gerbsäure nicht fällbaren. Indessen können wir aus den Versuchen 3 und 4 ersehen, dass die mit Phosphorwolframsäure fällbaren Substanzen eine Veränderung erfahren zu einer Zeit, wenn die mit Gerbsäure nachweisbaren Veränderungen schon zum Stillstand gekommen sind, was nach etwa 40 Stunden stattfindet.

Wir glauben auf Grund des Gesagten folgern zu können, dass die Milz von Rind, Pferd, Schaf und Schwein ein proteolytisches Enzym enthält, das am stärksten in saurer Lösung wirkt.

Ob das Enzym in Form von einem Zymogen vorhanden ist, das durch die Säure gespalten wird unter Freiwerden des Enzyms, oder ob die Säure für die Wirkung des freien Enzyms von Bedeutung ist, muss bis auf Weiteres dahingestellt bleiben.

In den bereits erwähnten Versuchen haben wir die Wirkung des Milzenzyms auf die im frischen Milzsaft vorhandenen Eiweisskörper untersucht; ausserdem haben wir auch die Frage in Angriff genommen, ob der Milzpresssaft auch zugesetzte Eiweisskörper zu digeriren im Stande sei.

Zu dem Zweck haben wir zunächst geprüft, ob eine mässige Verdünnung irgend einen Einfluss auf die Autolyse ausübt. Milzsaft wurde theils unverdünnt, theils mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt zur Digestion mit Essig-



Stickstoff, entsprechend 33 ccm. Säure, gefunden und im zweiten Falle entsprechend 32,8 ccm.

#### Versuch 9.

Durch diesen Versuch beabsichtigten wir die Einwirkung von Milzsaft (vom Rind) auf die Eiweisskörper des defibrinirten Blutes, sowie auf das Fibrin zu erforschen. Der Stickstoff von 5 ccm. Saft entsprach 34 ccm.  $\frac{1}{10}$  n-Säure.

Der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff entsprach für 5 ccm. unverdünnten Saftes nach Digestion mit Essigsäure (0,25 %) 40 Stunden lang 27,5 ccm. Säure.

10 ccm. defibrinirtes Blut + 10 ccm. Wasser wurden mit Essigsäure 40 Stunden lang digerirt. Der durch 20 ccm. Gerbsäurelösung nicht fällbare Antheil des Stickstoffs entsprach für 5 ccm. des Filtrats 0,7 ccm. Säure.

10 ccm. Milzsaft + 10 ccm. Blut wurden mit Essigsäure 40 Stunden digerirt und mit 20 ccm. Gerbsäurelösung gefällt. Der Stickstoff in 5 ccm. Filtrat entsprach 15,6 ccm. Säure. Wenn von dem Bluteiweiss nichts verändert worden wäre, hätte die Stickstoffmenge  $\frac{27,5}{4} + 0,7 = 7,6$  entsprechen sollen.

Derselbe Milzsaft wurde mit frischbereitetem Fibrin und Essigsäure versetzt (250 g handgepresstes Fibrin auf 450 ccm. Milzsaft). Nach einer Nacht war das Fibrin aufgelöst unter Hinterlassen eines feinen Pulvers und nach 40 Stunden wurde analysirt. Mit Berücksichtigung der durch das feuchte Fibrin verursachten Vermehrung des Flüssigkeitsvolumens wurde der durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoff in 5 ccm. unverdünnten Saftes, 57,4 ccm. Säure entsprechend, gefunden. Eine Kontrollprobe ohne Fibrin ergab 27,5 ccm.

#### Versuch 10.

10 ccm. Milzsaft wurden mit Essigsäure (0,25 %) und gekochtem Fibrin 40 Stunden lang digerirt. Dann wurde auf 20 ccm. verdünnt und mit 20 ccm. Gerbsäurelösung gefällt. Der Stickstoffgehalt von 5 ccm. nichtverdünnter Lösung entsprach 67,8 ccm. Säure. Eine Kontrollprobe ohne Fibrin ergab 32,8 ccm.

Wie ersichtlich, besitzt der Milzsaft das Vermögen, die Eiweisskörper des Blutes zu digeriren; besonders leicht wird das Blutfibrin von dem Saft aufgelöst. In der That scheint die Wirkung des Milzsaftes in saurer Lösung mit der des Trypsins verglichen werden zu können. Zum Vergleichen haben wir auch mit Pankreassaft, der in derselben Weise bereitet worden war wie der Milzsaft, Versuche über die Auto-digestion in saurer, neutraler und alkalischer Lösung vorgenommen. Der Saft reagirte sauer, und die Acidität entsprach für 100 ccm. etwa 33 ccm.  $\frac{1}{10}$ n-Lauge. Der gesammte Eiweissgehalt von 5 ccm. entsprach 61,7 ccm.  $\frac{1}{10}$ n-Säure. Die übrigen Resultate sind aus folgender Tabelle ersichtlich. Die Ziffern geben wie vorher die Anzahl  $\frac{1}{10}$ n-Säure an, welche dem in 5 ccm. vorhandenen Stickstoff entsprechen, der nicht durch Gerbsäure gefällt wird.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden
Mit Essigsäure (0,25%) . . . . .	20,7	50,0
Ohne Zusatz . . . . .	—	53,0
Neutralisirt . . . . .	—	55,2
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,2%) . . . . .	—	55,5

Aus diesem Versuche ist ersichtlich, dass die Einwirkung der Säure gerade entgegengesetzt der bei dem Milzsaft ist. Die Digestion in essigsaurer Lösung ist zwar eine sehr starke, aber immerhin schwächer als in neutraler und alkalischer, während das Milzenzym in neutraler und alkalischer Lösung entweder keinen oder nur einen schwachen Einfluss auf das Eiweiss ausübt. Wir glauben daraus folgern zu müssen, dass das Milzenzym nicht mit dem Trypsin identisch ist.

Arbeiten über die bei der Einwirkung des Milzsaftes auf Eiweisskörper entstandenen Produkte, sowie über andere nahe-liegende Fragen sind schon im hiesigen pathologisch-chemischen Laboratorium im Gange.

London, Jenner Institute of preventive Medicine, den 8. März 1901.



# Ueber ein neues Histon aus Fischsperma.

Von

Robert Ehrström aus Helsingfors.

---

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 28. März 1901.)

---

In der Absicht, Protamin darzustellen, liess ich aus Finland Testikeln des dort allgemein vorkommenden Fisches *Lota vulgaris* kommen. Trotzdem diese Hoden vollkommen reif waren, konnte ich aus ihnen kein Protamin gewinnen, wohl aber eine reichliche Menge eines Körpers, der die Eigenschaften eines Histons besass. Die Testikeln des *Lota vulgaris*, welcher dem zoologischen System nach zur selben Familie wie *Gadus Morrhua*, den Gadiden, gehört, zeigte sich, ebenso wie die Hoden dieser Fischart,<sup>1)</sup> frei von Protamin, im Gegensatz zu einer Anzahl anderer in dieser Richtung untersuchten Fische, wie Lachs, Hering, Stör, Makrele u. s. w. Ebenso scheint es sich mit dem Karpfen zu verhalten, vorausgesetzt, dass man berechtigt ist, die aus reifen Karpfentestikeln von Miescher<sup>2)</sup> isolirte «peptonartige Substanz von basischen Eigenschaften» als ein Histon auszusprechen. Einen gleichartigen basischen Eiweissstoff erhielt Miescher aus unreifen Lachstestikeln und Bang<sup>3)</sup> stellte ein Histon, «Scombron», aus unreifen Hoden der Makrele dar. Es kann ausserdem noch hinzugefügt werden, dass Mathews<sup>4)</sup> aus den reifen Spermatozoen eines Seeigels, *Arabacia*, ein Histon, das «Arabacin», gewann.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 191.

2) Verhandl. der naturforsch. Gesellsch. zu Basel, Bd. VI, S. 138.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXVII, S. 463.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXIII, S. 399.

Aller Wahrscheinlichkeit nach enthalten die Testikeln sämtlicher Fischarten in unreifem Zustande Histon, und zwar nach Kossel an Nucleinsäure gebunden. Dieses nucleinsaure Histon geht bei einigen Fischarten beim Reifwerden in nucleinsaures Protamin über, während dieser Process bei anderen nicht eintritt.

Nachdem ich eine Anzahl Versuche in verschiedenen Richtungen angestellt hatte, um die zweckmässigste Methode zur Isolirung des Lota-Histons zu finden, erwies sich folgendes Verfahren als das bequemste. Die Testikeln wurden zunächst in der von Kossel<sup>1)</sup> beschriebenen Weise behandelt und mit Alkohol und Aether ausgezogen. Die getrocknete Spermatozoenmasse wurde mit concentrirter Salzsäure in der Reibschale zerrieben und eine Stunde bei Zimmertemperatur der Einwirkung der Säure ausgesetzt. Darauf wurden drei bis vier Volumen Wasser hinzugefügt und der Niederschlag, welcher die Nucleinstoffe enthielt, abfiltrirt. Das Filtrat wurde mit Natriumhydrat neutralisirt und die neutralisirte Flüssigkeit mit dem fünffachen Volumen Wasser versetzt, wobei ein reichlicher Niederschlag entstand. Dieser wurde abfiltrirt und auf dem Wasserbad in etwa halbprocentiger Salzsäure aufgelöst. Aus der salzsauren Lösung wurde das Histon mit Ammoniak gefällt, wieder mit Salzsäure gelöst und mit Ammoniak gefällt, und dieser Process danach noch einmal wiederholt. Schliesslich wurde die Substanz gut mit Wasser ausgewaschen.

Die so gereinigte Substanz war sowohl in Wasser wie Neutralsalzlösungen von verschiedener Concentration vollkommen unlöslich, löste sich dagegen in Säuren und Alkalien. Eine Lösung der Substanz in verdünnten Säuren konnte mit Natriumhydrat für Lackmus neutral gemacht werden, ohne dass das Histon sich ausschied. Eine solche neutrale Lösung gab folgende Reactionen. Alkalihydrat oder Barythydrat, bis zur alkalischen Reaction hinzugefügt, erzeugten einen Niederschlag, der sich im Ueberschuss der Reagentien löste. Ammoniak gab ebenso einen im Ueberschuss löslichen

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 178.

vollständiger Niederschlag. Natriumpikrat und Ferrocyankalium gaben Niederschläge, welche sich bei Alkalizusatz lösten. Serumalbumine gaben gleichfalls einen in Ammoniak oder Alkalihydrat löslichen Niederschlag. Salpetersäure fällt den Körper nicht. Kupfersulfat, Quecksilbernitrat, Ferrichlorid und neutrales Bleiacetat erzeugen keinen Niederschlag, wohl aber basisches Bleiacetat. Wird die neutrale Histonlösung gekocht, scheidet sich ein in Säuren unlösliches Gerinnsel ab. Dagegen coagulirt eine saure Lösung des Körpers, also ein Salz des Körpers nicht. Eine mit Salzsäure bereitete Lösung dieses Histons wird nicht durch Alkohol gefällt, wogegen eine Lösung derselben in Schwefelsäure fällbar ist. Das Chlorid des basischen Eiweissstoffes ist demnach leicht löslich in Alkohol, das Sulfat schwerlöslich, ebenso wie die Chloride und Sulfate von verschiedenen Protaminen. Aether, auch in kleinen Mengen hinzugefügt, scheidet aus der Lösung das Histon in leichten, auf der Aetherschicht schwimmenden Massen ab. Dies Verhalten zeigt sich, wie mir Herr Professor Kossel mittheilte, auch bei Histonen anderen Ursprungs. Natriumchlorid salzt den Körper aus. Die Fällungsgrenzen für Ammoniumsulfat sind 4,1 und 4,9, d. h., wenn zu einer Histonlösung soviel Ammoniumsulfatlösung zugefügt wird, dass in 10 ccm. histonhaltiger Flüssigkeit 4,1 ccm. kalt gesättigte Ammoniumsulfatlösung enthalten sind, so beginnt das Histon auszufallen, und wenn in den 10 ccm. 4,9 ccm. gesättigte Ammoniumsulfatlösung enthalten sind, ist die Ausscheidung vollendet. Der Körper gibt schon in der Kälte schöne Biuretreaction und zwar mit violettem Farbenton. Die Xanthoproteinreaction ist positiv, Millon's Reaction schwach, aber deutlich positiv, Molisch's Reaction stark positiv, Adamkiewicz' Reaction schwach vorhanden.

Der aus Lota dargestellte Körper zeigt somit in seinen Reactionen recht bedeutende Abweichungen von den bisher gekannten Histonen. Dem Lota-Histon fehlen zwei der fünf Reactionen, welche Bang als charakteristisch für Histone

hat hervorheben wollen. Es ist weder durch Salpetersäure fällbar, noch verhält es sich beim Kochen seiner Lösung entsprechend diesen Angaben. Es unterscheidet sich weiter dadurch, dass es, durch Ammoniak gefällt, in Wasser und Neutralsalzlösungen unlöslich ist, oder wenigstens sehr schnell unlöslich wird. Es gibt auch positive Furolreactionen, während Bang diese sowohl bei Thymus-Histon, wie Globin und «Scombron» vermisste. Dagegen gab das von Schulz<sup>1)</sup> dargestellte Globin Adamkiewicz' Reaction «zwar schwach, aber ausgesprochen positiv», aber nicht Molisch's Reaction. Zwei Stickstoffanalysen von Lota-Histon nach Kjeldahl gaben ebenfalls abweichende Zahlen von dem bisher gekannten Stickstoffgehalt im Histon: 16,46% resp. 16,49%. Die entsprechende Zahl für Thymus-Histon ist nach Bang 18,35, für das Histon der rothen Blutkörperchen nach Kossel<sup>2)</sup> 18,46, für Globin nach Schulz 16,89, für Lachs-Histon nach Miescher 17,64, für «Scombron» nach Bang 19,79 und für Gadus-Histon nach Kossel 18,65. Einen geringen Stickstoffgehalt scheint das Arbacin zu besitzen, dessen Sulfat 15,91% N ergab.

Ein Zweifel an der Zugehörigkeit des vorliegenden Körpers zur Histongruppe kann jedoch nicht vorliegen. Dafür sprechen deutlich seine ausgeprägten basischen Eigenschaften, und mit noch grösserer Bestimmtheit die Resultate einer quantitativen Bestimmung der Vertheilung des Basenstickstoffs. 29,5 g des Körpers wurden mit siedender Schwefelsäure während 14 Stunden zersetzt, und die Zersetzungsprodukte nach der von Kossel zum Theil in Gemeinschaft mit Kutscher<sup>3)</sup> angegebenen Methode bestimmt, nur mit einer von Herrn Dr. Hart im hiesigen Laboratorium ausgearbeiteten Modification der Ammoniakbestimmung, die demnächst publicirt werden soll.

In der folgenden Tabelle sind die gefundenen Zahlen zusammengestellt und zum Vergleich die entsprechenden von Kossel und Kutscher für Gadus-Histon und Thymus-Histon bestimmten Zahlen hinzugefügt.

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 449.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. VIII, S. 511.

<sup>3)</sup> Diese Zeitschrift Bd. XXXI, S. 165.

	des Lota-Histons		des Gadus-Histons		des Thymus-Histons	
Gesammtmenge . . . . .	100	.	100	.	100	.
A. Basen-Stickstoff . . . . .	34,55	.	42,00	.	42,46	.
Davon a) im Ammoniak . . . . .	.	3,30	.	3,30	.	7,46
b) im Histidin . . . . .	.	4,12	.	3,30	.	1,79
c) im Lysin . . . . .	.	3,69	.	8,50	.	8,04
d) im Arginin . . . . .	.	23,44	.	26,90	.	25,17
B. Stickstoff in nicht be- stimmter Form . . . . .	65,45	.	58,00	.	57,54	.
Davon Humin-Stickstoff . . . . .	.	14,95	.	5,80	.	14,92

Die Menge der erhaltenen Basen in Procenten der zer-  
setzten Körper:

	Lota-Histon	Gadus-Histon	Thymus-Histon
Zersetztes Histon . . . . .	100	100	100
Ammoniak . . . . .	0,66	0,74	1,66
Histidin . . . . .	2,85	2,34	1,21
Lysin . . . . .	3,17	8,30	7,7
Arginin . . . . .	12,00	15,22	14,36

Die angeführten Zahlen zeigen deutlich die nahe Ver-  
wandtschaft zwischen den drei Körpern. Charakteristisch sind  
die basischen Eigenschaften, die damit offenbar in Zusammen-  
hang stehende Fällbarkeit mit Ammoniak und der hohe Ge-  
halt an Argininstickstoff. Das Lysin tritt in geringerer Menge  
auf, wie bei den übrigen Histonen, auch der Stickstoffgehalt  
des ganzen Moleküls ist etwas niedriger; immerhin ist die  
Gesammtmenge des Stickstoffs der harnstoffbildenden Gruppe  
und der Diamidosäuren eine relativ hohe. Bemerkenswerth ist  
auch das Vorkommen der «Kohlehydratgruppe» im Lota-Histon.

Zuletzt will ich die Gelegenheit benutzen, um Herrn  
Professor Kossel meinen verbindlichsten Dank für die mir  
angewiesene Arbeit und die mir dabei freundlichst gewährte  
Unterstützung beim Ausführen derselben auszusprechen.

# Ueber Psyllawachs, Psyllostearylalkohol und Psyllostearylsäure (Psyllaalkohol, Psyllasäure).

## III. Mittheilung.

Von

Ernst Edw. Sundwik.

---

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Helsingfors.)

(Der Redaction zugegangen am 30. März 1901.)

---

Ich habe in 3 Publicationen (diese Zeitschrift, Bde. XVII und XXV) die Untersuchungen veröffentlicht, welche ich über das von Psylla Alni, einer auf Alnus incana lebenden Blattlaus, erzeugte Wachs angestellt habe. Da ich keine Säure bei der Spaltung wahrnehmen konnte, habe ich mich für berechtigt gehalten, die Substanz als einen Aether zu charakterisiren. Nunmehr ist es mir gelungen, auch eine Säure darzustellen und die Wachssubstanz als einen Ester von der Zusammensetzung  $C_{33}H_{67} \cdot O \cdot C_{33}H_{65}O$  festzustellen. Die eigenartigen Eigenschaften der sehr schwachen Säure, die Unlöslichkeit auch ihrer Alkalisalze in Wasser und Alkohol neben anderen Umständen, mögen als entschuldigende Momente dienen, um so mehr, als ich stets mit nur geringen Mengen arbeiten konnte.

Das Psyllawachs wird, wie ich gezeigt habe, am besten durch halbstündiges Erhitzen im Oelbade bei  $210-220^{\circ} C.$  mit Bromwasserstoffsäure von 1,49 specifischen Gewichts verseift. Beim Oeffnen des zugeschmolzenen Rohres nimmt man keinen Druck wahr. Die grobe, krystallinische Masse wird gepulvert, mit Wasser völlig von Säure befreit und nach dem Trocknen mit Chloroform im Extractionsapparate gelöst. Nur sehr geringe Spuren einer kohligen Masse bleiben ungelöst. Nach Verdunstung des Lösungsmittels bleibt der Stoff völlig farblos zurück.

Methoden bewirken. Erstens durch Zusatz von etwas starker Natronlauge zur alkoholischen Lösung, wobei sowohl Säure als Alkohol ausgeschieden wurden, jene als Natriumsalz. Ein Zusatz von Wasser begünstigt die Ausscheidung. Die Masse wird abfiltrirt, völlig ausgewaschen, getrocknet und mit Chloroform oder besser Aether oder Benzol im Extractionsapparat ausgezogen. Der Rückstand wird nach dem Trocknen in mit etwas Eisessig versetztem Alkohol auskrystallisirt.

Zweitens habe ich das Verseifungsprodukt in heissem Alkohol gelöst, mit Baryt und Chlorbaryum gefällt, ausgewaschen und weiterhin wie oben behandelt. Nur habe ich vor der Extraction den Baryt mit verdünnter, heisser Chlorwasserstoffsäure entfernt.

Aus Benzol, Petroleumäther, Chloroform und anderen Lösungsmitteln krystallisirt der Alkohol in seideglänzenden Schuppen, die Säure in viereckigen, rautenförmigen, dünnen Blättern, mit Winkeln von je  $74^{\circ}$  und  $106^{\circ}$ . Es waren eben diese Krystalle, die ich als die dem Alkohol zugehörigen betrachtete. Es lag nahe, anzunehmen, dass die Krystalle, von denen ich stets nur wenig bekam, den besonders reinen Alkohol darstellten. Durch meine Arbeitsmethode ging früher der grösste Theil der Säure verloren.

Ich gehe nun zur Ermittlung der Zusammensetzung des Waxes, der Säure und des Alkohols über.

### 1. Das Psyllawachs.

Durch meine früher angeführten Elementaranalysen habe ich darthun können, dass die Formel desselben  $C_{33}H_{66}O$  oder ein Multiplum sein muss. Ich habe später mehrere Molekularbestimmungen gemacht, welche im Mittel 984 gaben; unter den Bestimmungen gab eine als Molekulargewicht die Zahl 954,6. Später habe ich noch eine solche Bestimmung gemacht mit folgendem Resultat:

1,13 g in 50 ccm.  $C_6H_6$  (= 44 g) entspricht 2,5% an Stoff.  $t^{\circ}-t^{\circ} = 0,068$ , also Molekulargewicht gleich 981,6.

$C_{33}H_{66}O$  entspricht dem Molekulargewicht 478. Die Formel muss also verdoppelt und  $C_{66}H_{132}O_2$  geschrieben werden, ent-

sprechend dem Gewicht 956. Ein so geringer Fehler, wie hier vorhanden, kommt nicht in Betracht, da die Möglichkeit einer genauen Bestimmung bekanntlich mit der Grösse des Moleküls abnimmt.

Um zu erfahren, ob wirklich das Wachs in zwei fast ebenso grosse Moleküle zerfällt, habe ich zwei verschiedene Wege eingeschlagen:

a) 1 g des völlig verseiften und vor dem Wägen getrockneten Wachses wurde in Alkohol gelöst, mit Baryt gefällt, mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Dem getrockneten Produkt wurde der neue Alkohol mit Benzol entzogen, getrocknet und gewogen. Der ungelöste Rückstand wurde mit heisser, verdünnter Salzsäure behandelt, ausgewaschen, getrocknet und in derselben Weise extrahiert. Die Säure wurde als trocken gewogen.

Ich erhielt: Alkohol 0,52 g, Säure 0,57 g, zusammen 1,09 g. Die Alkoholmenge bzw. Säuremenge sollte sich wie 0,54 : 0,57 verhalten; die Zahlen sind also hinreichend genau.

b) 0,390 g der mit HBr verseiften Substanz, wohl getrocknet, wurde in 50 ccm. Benzol (= 44 g) gelöst. Lösung also = 0,886 %.  $t^{\circ}-t^{\circ} = 0,049$ ; hieraus berechnet sich das Molekulargewicht zu 482 als Mittelgehalt von 1 Molekül Säure und 1 Molekül Alkohol, anstatt 487. Die Annahme, dass die beiden Moleküle fast gleich seien, ist auch hiermit bewiesen. Es gilt nunmehr, nur noch die Säure und den Alkohol zu analysiren bzw. deren Molekulargewicht zu bestimmen.

## 2. Die Psyllostearylsäure (Psyllasäure).

Die vorher genannte, aus Essigsäure enthaltendem Aethylalkohol auskrystallisirte Säure wurde analysirt und zwar mit folgendem Resultat:

0,182 g gaben 0,5342 g  $\text{CO}_2$  = 0,1457 g C = 80,05 %,

ebenso: 0,2252 g  $\text{H}_2\text{O}$  = 0,02502 g H = 13,75 %.

$\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{O}_2 = \text{C}_{33}\text{H}_{66} \cdot \text{COOH}$  erfordert 80,16 % C und 13,36 % H. Es war also die reine Säure vorhanden.

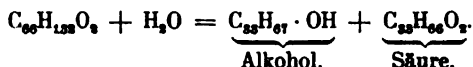
Ich habe, um sicher zu sein, auch noch das Molekulargewicht bestimmt:

0,2575 g in 40 ccm.  $\text{C}_6\text{H}_6$  gelöst (specifisches Gewicht = 0,882), also = 35,28 g  $\text{C}_6\text{H}_6$ . Die Lösung enthielt also 0,726 % und das Molekulargewicht berechnet sich zu 497 (statt 494).

Die Zusammensetzung  $\text{C}_{33}\text{H}_{66}\text{O}_2$  zeigt, dass es nur eine einbasische Säure sein kann.



Aus dem Vorhergehenden ist ersichtlich, dass dem Alkohol nur die Zusammensetzung  $C_{33}H_{67} \cdot OH$  zukommen kann, in Anbetracht nicht nur der Spaltungsprodukte, sondern auch der Zusammensetzung des ursprünglichen Körpers. Die Spaltung kann nur in folgendem Sinne verlaufen:



Wie leicht einzusehen ist, ist auch die Möglichkeit einer zwei- oder mehrwerthigen Säure oder Alkohol ausgeschlossen. Ich habe dennoch eine Molekulargewichtsbestimmung vorgenommen:

0,24 g des Alkohols wurde in 50 ccm.  $C_6H_6$  ( $= 0,88$  spezifisches Gewicht), also 44 g, gelöst. Die Lösung enthielt 0,5425 % Stoff.

$t^\circ - t'^\circ = 0,029$  und das Molekulargewicht berechnet sich zu 496 anstatt 480.

Hiermit dürfte also bewiesen sein, dass das Psyllawachs eine neutrale Verbindung eines einwerthigen Alkohols  $C_{33}H_{67} \cdot OH$  mit einer einbasischen Säure  $C_{33}H_{65} \cdot COOH$  ist. Die Eigenschaften des Waxes wie auch des Alkohols sind unverrückt dieselben, die ich in meinen früheren Publicationen ihnen zugetheilt habe.

Um noch sicherer zu sein, habe ich den Benzoessäure-ester des Alkohols dargestellt und analysirt.

Der Alkohol wurde mit der berechneten Menge Benzoesäureanhydrid im offenen Gefäß im Oelbade bis zu 150—165° erhitzt, erkalten gelassen und mehrmals aus Benzol und Petroläther umkrystallisirt. Der bei 68—69° schmelzende Ester gab bei der Analyse folgende Zahlen:

0,2440 g gaben 0,6915 g  $CO_2 = 0,1886$  g C  $= 77,29\%$ ,

ebenso: 0,2207 g  $H_2O = 0,03008$  g H  $= 12,33\%$ .

Die Formel  $C_{33}H_{67} \cdot O \cdot C_7H_5O$  erfordert 77,42 % C und 12,26 % H.

Ich lasse hier noch eine Tabelle über das Verhalten der oben behandelten Stoffe in physikalischer Hinsicht folgen:

Eigenschaften	Das Peyllawachs	Der Benzoeester	Der Peyllaalkohol	Die Peyllaäsure	Bemerkungen
1. Beschaffenheit .	Etwas klebrig.	Klebrig.	Klebrig.	Nicht klebrig.	Ein Geh. an Wasser übt grossen Einfluss auf die Löslichkeit des Alkohols aus.
2. Löslichkeit . . .	Unlöslich in fast allen kalten Lösungsmitteln, auch in heissem Aether. Leicht löslich in heissem Chloroform u. Benzol. Fast ohne Rückstand flüchtig.	Ziemlich schwer, auch in heissem Petroläther, löslich, ebenso in kaltem Aether u. Benzol, leicht löslich in heissem. Ebenso.	In Petroläther (heiss) zieml. leicht löslich. Leicht in heissem Benzol und Aether. Ebenso.	In Petroläther (heiss) schwer lösl., auch ziemlich schwer in heissem Aether. Ebenso.	
3. Flüchtigkeit . .		Ebenso.	Ebenso.	Ebenso.	
4. Wasserbindend .	Stark.	Stark.	Stark.	Nicht.	
5. Krystallform . .	Nadeln (Seideganz).	Verflitzte Nadeln (Seideganz).	Scheinbar Schuppen (Seideganz).	Rhomb. Rauten von 74° u. 106° Winkel.	
6. Schmelzpunkt .	96°.	68—69° (?)	68—70° (?)	94—95°.	
7. Elektrisch beim Reiben? . . . .	Stark elektrisch.	Elektrisch.	Stark elektrisch.	Nicht elektrisch.	
8. Nach Schmelzung gestanden . . . .	Wachsartig.	Wachsartig.	Wachsartig.	Grobkrystall.	Die verseifte Masse grobkrystallinisch.

auch der Umstand, dass die Salze unlöslich und amorph sind, machen es unmöglich, Analysen von Salzen zu erhalten, obgleich die schön krystallisirende Säure unschwer zu erhalten ist. Die Salze ziehen sich in das Filterpapier hinein und sind dann nach dem Trocknen nicht davon loszumachen. Auch das Silbersalz verhält sich ebenso, obgleich es ungewöhnlich beständig ist. So verfärbt es sich z. B. erst nach längerer Beleuchtung.

Ueber die Schmelzpunkte des Benzoessäureesters und des Alkohols bin ich nicht völlig sicher, da ja bekanntlich auch sehr geringe Beimischungen bedeutende Erniedrigungen zur Folge haben. Nach Beschaffung von etwas mehr Material beabsichtige ich eine neue Bestimmung zu machen.

Helsingfors, Physiologisch-chemisches Institut.

---

# Beiträge zur Kenntniss der Eiweisskörper.

Von

Docent Dr. **Adolf Jolles** in Wien.

---

(Aus dem chemisch-mikroskopischen Laboratorium von Dr. M. und Dr. A. d. Jolles in Wien.)

(Der Redaction zugegangen am 1. April 1901.)

---

Die bisher an isolirten reinen Eiweisssubstanzen durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass die Elementaranalysen allein durchaus nicht genügen, einen Einblick in die Constitution der Eiweisskörper zu bieten, und dass vor Allem die grossen Verschiedenheiten, die zwischen den einzelnen Eiweisskörpern trotz ihrer ähnlichen procentischen Zusammensetzung bestehen, uns veranlassen müssen, unser Hauptaugenmerk auf die Gruppierung der Elemente im Eiweissmolekül zu lenken.

Um nun der Frage der Gruppierung näher zu treten, gibt es bei den Eiweissstoffen nur folgenden Weg:

Der zu untersuchende Körper muss der Einwirkung verschiedener Reagentien unterworfen werden, die je nach ihrer chemischen Beschaffenheit gewisse Complexe unangegriffen lassen. Diese Complexe sind dann als die Componenten des zu untersuchenden Körpers aufzufassen, und diese Annahme hat um so mehr Wahrscheinlichkeit, je glatter und quantitativer die Einwirkung der Reagentien stattfindet.

Von diesem Gesichtspunkte aus sind bereits eine Reihe von Arbeiten erschienen, welche sich mit der Spaltung des Eiweisses durch verschiedene Reagentien befassen. Die wesentlichsten Spaltungsprodukte waren: Amidosäuren (Glycocoll, Leucin, Monoamidovaleriansäure, Asparaginsäure und Glutaminsäure), aromatische Körper (Tyrosin, Indol, Skatol), Kohlehydrate, ein wenig erforschter schwefelhaltiger Complex und endlich die in jüngster Zeit aufgefundenen Hexonbasen (Lysin, Arginin, Histidin), welche in jedem Molekül mehrere Amidogruppen enthalten.

die von P. Schützenberger,<sup>1)</sup> welcher Proteinstoffe sowohl der Einwirkung von verdünnter Schwefelsäure als von Aetzbaryt in wässeriger Lösung unterworfen hatte. Schützenberger gelangte auf Grund seiner Versuchsergebnisse zu der Annahme, dass im Eiweissmoleküle Oxamidgruppen vorhanden sind, eine Annahme, die nach der kürzlich erschienenen Arbeit von J. Habermann und Ehrenfeld<sup>2)</sup> unhaltbar geworden ist. Ebenso war es diesen Forschern unmöglich, den von Schützenberger angenommenen quantitativen Ausdruck für das Vorhandensein der Harnstoffgruppe im Eiweissmoleküle verificiren zu können, indem sie nachweisen konnten, dass das von Schützenberger gefundene constante Verhältniss von Ammoniak zu Kohlensäure bei der genannten Spaltung als sehr zweifelhaft zu bezeichnen ist. Einen werthvollen Beitrag zur Kenntniss der Eiweisskörper haben Kossel und seine Mitarbeiter<sup>3)</sup> geliefert, indem es diesen Forschern gelungen ist, das Vorkommen der Hexonbasen, deren genauere chemische Natur im Wesentlichen aufgeklärt ist, bei der Spaltung sämtlicher Eiweisskörper zu constatiren. Hierauf gestützt, betrachtet Kossel diese Substanzen als Kern des Eiweissmoleküls, an den die übrigen Complexe (aliphatische und aromatische Amidosäuren u. s. w.) angelagert sind.

Eine Arbeit, welche auf der Charakterisirung der Spaltungsprodukte der Eiweisskörper durch Gruppenreactionen beruht, ist die von Hausmann,<sup>4)</sup> in der er der Constitution des Eiweisses mit Bezug auf die Stickstoffvertheilung durch quantitative Gruppenreactionen näher kommen wollte. Wenn es auch nicht möglich ist, aus den erhaltenen Resultaten sich

---

1) Bulletins de la Société chimique de Paris, Bd. XXIII; Annales de Chimie et de Physique, XVI, V. Série.

2) Ueber Proteinstoffe. Von J. Habermann und R. Ehrenfeld. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXX, S. 453.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXIII, S. 115 und 402; Bd. XXV, S. 165; Bd. XXVI, S. 588; Bd. XXVII, S. 463; Bd. XXXI, S. 165. Deutsche medic. Wochenschrift, 1894, S. 147.

4) Ueber die Vertheilung des Stickstoffes im Eiweissmolekül. Von Cand. med. Hausmann. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 95.

ein präcises Bild über die Stickstoffgruppierung im Gesamtmolekül zu machen, so geht doch aus ihr hervor, dass zwischen den verschiedenen Eiweisskörpern sehr beträchtliche Unterschiede in der chemischen Structur bestehen müssen. Allerdings ist zu bemerken, dass gegen die von Hausmann angewandte Methodik von Kutscher<sup>1)</sup> gewichtige Einwände erhoben worden sind.

Cohn<sup>2)</sup> hat bei der Behandlung von Eiweisskörpern mit Säuren einen Körper erhalten, den er aus dem Leucinimid durch Verdoppelung des Moleküls und Bildung eines Piperazinderivates erklärt. Die Entstehung der piperazinähnlichen Derivate aus dem Eiweiss leitet Cohn aus den Imiden der Amidosäuren ab, wobei er annimmt, dass je zwei Moleküle unter Wasseraustritt zu einem ringförmigen Complexe zusammentreten, womit die Annahme, dass Amidosäuren Componenten des Eiweisses sind, eine weitere Stütze findet.

In jüngster Zeit hat Pröscher<sup>3)</sup> versucht, die Spaltung von Eiweisskörpern, speciell von krystallisiertem Hämoglobin, durch Zinnchlorür und Salzsäure quantitativ zu verfolgen und ist hierbei zu dem Resultate gekommen, dass bei der Summierung der durch die jetzigen Methoden isolirbaren Bestandtheile nur die Hälfte an Kohlenstoff und Stickstoff wieder gefunden wird, woraus zu schliessen ist, dass die von ihm durchgeführte Reaction kaum im Stande ist, uns in die Zusammensetzung des Eiweisses einen einwandfreien Einblick zu gestatten.

Oxydationsversuche an Eiweisskörpern sind mit Erfolg vor Allem von Hofmeister<sup>4)</sup> gemacht worden. Hofmeister

---

1) Ueber die Verwendung der Phosphorwolframsäure bei quantitativen Bestimmungen der Spaltungsprodukte des Eiweisses. Von Fr. Kutscher. Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXXI, S. 215.

2) Ueber die Bildung von Basen aus Eiweiss. Von Prof. Cohn.

3) Ein Beitrag zur Erforschung der Constitution des Eiweissmoleküls. Von Fr. Pröscher. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 114.

4) Ueber Bildung des Harnstoffes durch Oxydation. Von Franz Hofmeister. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd. XXXVII, S. 426—444.

Anwesenheit eines Ueberschusses von Ammoniak Harnstoff in relativ geringen Mengen nachgewiesen. Eine Discussion der von ihm erhaltenen Resultate erfolgt an einer anderen Stelle dieser Arbeit.

Wie aus Vorstehendem ersichtlich, sind mit verschiedenen Reagentien Eiweissspaltungen vorgenommen worden, die verschiedene Spaltungsprodukte ergeben haben, die dann als Componenten des Eiweisses angesehen wurden. Eine definitive Klärung des Problems der Eiweisszusammensetzung ist jedoch nur dann zu erhoffen, wenn eine grössere Anzahl von glatt verlaufenden Spaltungen bekannt ist, so dass uns so zu sagen mehrere Schnitte durch das Eiweissmolekül in verschiedener Richtung zu Gebote stehen, die in ihrer Gesammtheit ein vollständiges Bild liefern. Nach den Erfahrungen, die ich bei den Purinkörpern<sup>1)</sup> gemacht habe, glaubte ich im Permanganat in schwefelsaurer Lösung ein Reagens zu haben, welches auch hier die Aussicht auf eine leicht zu verfolgende und glatte Spaltung bietet, und hierdurch wurde ich veranlasst, die verschiedenen Eiweisskörper analog zu behandeln. Der Vortheil dieser Methode besteht darin, dass gewisse Körper, wie Harnstoff, Mono- und Diamidosäuren unter den angegebenen Bedingungen nicht weiter verändert werden, was gegenüber den alkalischen Spaltungen, bei denen der Harnstoff zu Ammoniak zerfällt, und auch Diamidosäuren nicht unangegriffen bleiben, ein wesentlicher Vortheil ist. Ausserdem ermöglicht das Verschwinden der Permanganatlösung bei der Oxydation eine Fixirung des Endpunktes, wodurch die gleichmässige Spaltung gesichert ist, sofern man sich an gleichbleibende Concentration und Temperatur hält.

#### Beschreibung des Verfahrens.

0,4—0,6 g Substanz wurden abgewogen, in ein Becherglas von etwa 600 ccm. Inhalt gebracht, mit ca. 400 ccm.

---

<sup>1)</sup> Ueber eine quantitative Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten. Von Adolf Jolles. Ber. d. deutsch. chem. Ges., Bd. XXXIII, S. 1246 und 2120.

destillirtem Wasser versetzt, 10 ccm. concentr. Schwefelsäure vom spec. Gewichte 1,84 hinzugesetzt, auf dem Drahtnetze erwärmt und Permanganatlösung (ca. 4 g pro Liter) allmählich hinzugesetzt. Zu Beginn des Erwärmens kann der Zusatz der Permanganatlösung cubikcentimeterweise erfolgen; sobald sich die Lösung langsam zu entfärben beginnt, setzt man das Permanganat nur tropfenweise so lange hinzu, bis der letzte Permanganatzusatz nach  $\frac{1}{2}$  stündigem Kochen nicht verschwunden ist. Es ist darauf zu achten, dass während der Oxydation die Concentration der Lösung durch zeitweiliges Nachfüllen mit destillirtem Wasser annähernd gleich erhalten bleibe; es empfiehlt sich, das Becherglas während der Oxydation mit einem Uhrglase bedeckt zu halten. Sobald nach dem  $\frac{1}{2}$  stündigen Kochen die Färbung der Permanganatlösung nicht verschwunden ist, entfärbt man den Ueberschuss von Permanganat mit einigen Tropfen sehr verdünnter Oxalsäure. Hierauf füllt man den Inhalt des Becherglases in einen  $\frac{1}{2}$  Liter-Kolben, spült nochmals mit destillirtem Wasser nach und kühlt den Inhalt des Kolbens ab.

Nunmehr setzt man allmählich Lauge hinzu, wobei nach jedesmaligem Zusatze der Lauge umgeschüttelt und gekühlt wird. Sobald das Mangan auszufallen beginnt, unterbricht man den Zusatz der Lauge und füllt den Inhalt des Kolbens mit destillirtem Wasser bis zur Marke auf. Von dieser Lösung werden nun folgende Bestimmungen durchgeführt:

#### I. Volumetrische Bestimmung des Stickstoffes.

100 ccm. der Lösung werden in das Schüttelgefäß des Azotometers <sup>1)</sup> gebracht, dann bringt man in das kleine Hartgummigefäß ca. 30—40 ccm. Bromlauge (25 g Brom und 80 g NaOH auf  $\frac{1}{2}$  Liter aufgefüllt) und geht im Uebrigen so vor, wie ich es bereits in extenso bei der volumetrischen Bestimmung der Harnsäure angegeben habe.

---

<sup>1)</sup> Siehe Zeitschr. für physiol. Chemie, Bd. XXIX, S. 236. (Ueber eine neue zuverlässige Methode zur quantitativen Bestimmung der Harnsäure im Harne. Von Adolf Jolles).



100 bis 200 ccm. der Lösung werden mit dem gleichen Volumen destillirten Wassers verdünnt, mit etwas überschüssiger Salzsäure versetzt, am Wasserbade erwärmt, bis die Lösung farblos wird, dann die Lösung etwas eingedampft und hierauf unter Zusatz von etwas Phenolphthalein mit alkoholischer Natronlauge (30 g reines Aetznatron in wenig Wasser gelöst und mit 95%igem Alkohol auf 1 Liter aufgefüllt) versetzt, bis eine schwache Rothfärbung eintritt. Hierauf säuert man mit einem Tropfen verdünnter Salzsäure an, wobei die Rothfärbung verschwindet. Nunmehr lässt man die Lösung ca. 2 Stunden lang stehen, wobei sich ein Theil der Salze ausscheidet, filtrirt hierauf und wäscht den Niederschlag mit absolutem Alkohol mehrmals aus. Das Filtrat wird auf ca. 20 ccm. auf dem Wasserbade eingedampft, abkühlen gelassen und abermals mit 100 ccm. absolutem Alkohol versetzt. Nach mehrstündigem Stehen werden die ausgeschiedenen Salze neuerdings filtrirt und ausgewaschen. Das Filtrat wird abermals auf ein kleines Volumen eingedampft, und der weitere Vorgang so oft wiederholt, bis das eingedampfte und abgekühlte Filtrat keine Ausscheidung von Salzen mehr zeigt. Nunmehr fügt man zu dem Rückstande ca. 100 ccm. einer gesättigten ätherischen Oxalsäurelösung hinzu, rührt um und lässt das bedeckte Glas bei gewöhnlicher Temperatur 24 Stunden lang stehen. Alsdann wird filtrirt, mit dem Filtrate das Becherglas ausgespült und der Niederschlag mit Aether ausgewaschen. Nunmehr wird das Filter sammt Niederschlag in einem Exsiccator über Schwefelsäure getrocknet, gewogen und der Stickstoff nach Kjeldahl in bekannter Weise bestimmt.

### **III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.**

100 ccm. der Lösung werden in ein Becherglas gebracht, mit der oben angegebenen Bromlauge versetzt, mit einem Uhrglase bedeckt und umgerührt. Nach circa einstündigem Stehen ist die Gasentwicklung vollkommen beendet. Nunmehr bringt man in das Gefäss einen Ueberschuss von Salzsäure, kocht das Brom aus, bis nach vollkommener Austreibung des

Broms die Flüssigkeit ganz farblos erscheint. Hierauf setzt man nach dem Abkühlen einen Ueberschuss an salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure <sup>1)</sup> hinzu, wobei in Anwesenheit fällbarer Substanzen sofort eine milchweisse Fällung auftritt. Nach 24-stündigem Stehen wird der abgeschiedene Niederschlag filtrirt, wobei der noch am Glase haftende Niederschlag mit Hülfe des Filtrates auf das Filter gebracht wird. Hierauf wird der Niederschlag sammt Filter getrocknet und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

#### **IV. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlags nach Kjeldahl.**

---

#### **Eintheilung der Spaltungsprodukte des Eiweisses mit Bezug auf das vorstehende Verfahren.**

I. Die volumetrische Bestimmung ergibt nur den Stickstoff aus Ammoniak und Harnstoff.

II. Nachdem hier nur der Harnstoff bestimmt wird, so lässt sich aus der Differenz von I und II das bei der Differenz eventuell auftretende Ammoniak bestimmen.

III. In dem Phosphorwolframsäureniederschlag können bei dem angegebenen Verfahren, wie ich mich durch einschlägige Versuche überzeugt habe, auftreten: Methylamin, Diamidosäuren und Glycocoll. <sup>2)</sup>

IV. Im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlags findet sich bei einzelnen Eiweisskörpern ebenfalls ein Stickstoffgehalt. Welchen Verbindungen dieser Stickstoffgehalt zuzuschreiben ist, ist derzeit noch unentschieden. Man könnte hier beispielsweise an unvollständig ausgefällte Monoamidosäuren denken.

Den Stickstoff dieser Verbindungen werde ich kurzweg Filtrat-Stickstoff nennen.

---

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der auf-

---

<sup>1)</sup> 2—3 g feste Phosphorwolframsäure werden unter Zusatz von Salzsäure gelöst und eventuell filtrirt.

<sup>2)</sup> Notiz über Glycocoll. Von Adolf Jolles. Zeitschrift für physiologische Chemie, Band XXXI, S. 389.

(Arginin, Histidin, Lysin etc.) aufzulassen ist, da dieselben beim Kochen mit Permanganat in saurer Lösung unter den von mir angegebenen Bedingungen keinen Harnstoff liefern. Wenn einzelne Forscher aus Hexonbasen, wie Arginin, Lysin und Lysatinin, durch Sieden mit Barytwasser Harnstoff erhalten haben und diese Erscheinung auf den Organismus derart übertragen, dass sie eine rein hydrolytische Bildung des Harnstoffes aus dem Eiweiss, also ohne Oxydation, annehmen, so erscheint diese Folgerung unzulässig, weil die Hexonbasen in den Eiweisskörpern in relativ geringen Mengen vorhanden sind, und der Stickstoff der Hexonbasen nur zum Theil in Harnstoff umgewandelt wird, z. B. beim Arginin im Maximum die Hälfte.

Ausserdem zeigen die Eigenschaft der Harnstoffbildung durch Barytlauge nur jene Hexonbasen, welche den Harnstoff- oder Guanidinrest bereits enthalten, somit nur ein Theil der Hexonbasen.

#### **Untersuchung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf die Anwesenheit von Hexonbasen.**

Den Phosphorwolframsäureniederschlag habe ich einer qualitativen Prüfung auf die Anwesenheit von Hexonbasen unterzogen. Bekanntlich hat zuerst Drechsel<sup>1)</sup> die Entdeckung gemacht, dass bei der hydrolytischen Spaltung von Eiweisskörpern auch Substanzen von ausgesprochen basischem Charakter auftreten. Als später Kossel<sup>2)</sup> und Hedin<sup>3)</sup> die Methodik des Nachweises der drei basischen Spaltungsprodukte: Arginin, Histidin und Lysin — wesentlich exacter gestaltet haben, gelang es, in allen untersuchten Eiweisskörpern diese Substanzen nachzuweisen. In Anbetracht der enormen Zeitinanspruchnahme, welche die Beschaffung eines genügend grossen Ausgangsmateriales beansprucht hätte, habe ich mich damit begnügt, in dem quantitativ gewonnenen Phosphorwolframsäureniederschlage die erwähnten basischen Spaltungsprodukte qualitativ nachzuweisen.

1) Ber. der mathem.-physik. Classe der Kgl. Sächs. Gesellschaft der Wissensch. 1892. S. 116.

2) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 155.

3) Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXV, S. 165.

Stickstoffgehalt an Arginin, Lysin und Histidin und sonstigen durch Phosphorwolframsäure fällbaren Spaltungsprodukten ausser Harnstoff und Ammoniak. Dies gilt nur unter dem Vorbehalte, dass die Fällung mit Phosphorwolframsäure hauptsächlich quantitativ erfolgt, was nach den bisherigen Resultaten zu erwarten ist. Im gegentheiligen Falle würde noch ein Theil dieser stickstoffhaltigen Körper im Filtrate sich vorfinden. Eine Identificirung dieser Substanzen kann selbstverständlich nur auf Grund von Versuchen mit sehr bedeutenden Substanzmengen vorgenommen werden.

### **Experimenteller Theil.**

Ich habe für meine Untersuchungen herangezogen: krystallisirtes Eialbumin, krystallisirtes Serumalbumin, krystallisirtes Serumglobulin (aus Pferdeblut), krystallisirtes Oxyhämoglobin (Pferd), Casein, Fibrin, Antipepton, Vitellin aus Eigelb, Vitellin aus Pflanzen.

#### **Krystallisirtes Eialbumin.**

##### **Darstellung.**

Hühnereiweiss wurde zu Schaum geschlagen, 24 Stunden stehen gelassen, filtrirt, mit dem gleichen Volumen gesättigter schwefelsaurer Ammonlösung versetzt, wieder filtrirt, nach Hofmeister <sup>1)</sup> bis zur Ausscheidung von Globuliten-Warzen verdunsten gelassen, dieselben ausgepresst, in einer halbgesättigten Ammonsulfatlösung gelöst und wieder verdunsten gelassen. Der erhaltene Krystallbrei wurde filtrirt, in Wasser gelöst, und das anhaltende Ammoniumsulfat durch Dialyse möglichst entfernt. Aus der so resultirenden Lösung wurde das Eiweiss durch Fällung mit Alkohol und Erhitzen gewonnen, das erhaltene Eiweisspräparat mit Wasser, Alkohol, Aether gewaschen und bei ca. 105° C. getrocknet.

##### **Analytischer Theil.**

Von allen Substanzen, die zur oxydativen Spaltung herangezogen wurden, wurde der Stickstoffgehalt nach Kjeld-

---

<sup>1)</sup> Fr. Hofmeister, Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XIV, S. 165 und Bd. XVI, S. 187.

die nachstehend verzeichneten Kjeldahl-Bestimmungen zur Kontrolle doppelt ausgeführt.

0,3642 g Substanz lieferten nach Kjeldahl

0,05455 g Stickstoff, entsprechend 14,98 % Stickstoff.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5030 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

#### I. Volumetrische Bestimmung.

100 ccm. der Lösung = 0,1006 g Substanz lieferten 10,7 ccm. Stickstoff bei 24°, 748 mm. B = 11,7807 mg Stickstoff = 11,71 % Stickstoff.

#### II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,2012 g Substanz lieferten 0,0875 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung ergab 0,0237 g Stickstoff, entsprechend 11,8 % Stickstoff.

#### III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

200 ccm. der Lösung wurden nach vorschriftsmässiger Entfernung des Harnstoffes durch Bromlauge und Austreibung des überschüssigen Broms durch Kochen mit Salzsäure mit Phosphorwolframsäurelösung gefällt. Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,2012 g Substanz gaben 0,0068 g Stickstoff, entsprechend 3,12 % Stickstoff.

#### IV. Identificirung des Harnstoffes.

Zur genauen Identificirung des durch Oxydation aus dem Eialbumin gewonnenen Harnstoffes wurden wiederholt geringe Mengen des reinen Präparates nach obigem Verfahren oxydirt, die Niederschläge von oxalsaurem Harnstoff gesammelt und bis zum constanten Gewichte getrocknet. Auch wurde aus dem Oxalate der Harnstoff rein dargestellt und durch den Schmelzpunct identificirt:

Die Analyse des Oxalates ergab folgende Werthe:

a) 0,2184 g Substanz lieferten 0,1852 g  $\text{CO}_2$  u. 0,0964 g  $\text{H}_2\text{O}$   
( $\text{CON}_2\text{H}_4$ ) $_2$  $\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ . Berechnet: C 22,86 % H 4,76 %.  
Gefunden: C 23,12 % H 4,90 %.

0,0875 g Substanz gaben 0,0237 g Stickstoff.

Berechnet: Stickstoff 26,66%; gefunden: Stickstoff 27,08%.

c) In 0,1501 g Substanz wurde die Oxalsäure mit Permanganatlösung titirt. (1 ccm.  $\text{KMnO}_4 = 0,002257 \text{ g C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ ). Verbrauchte wurden 28,6 ccm.  $\text{KMnO}_4$  Lösung = 0,0645 g  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ .

Berechnet:  $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$  42,86%; gefunden: 42,97%.

#### **Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlags auf Hexonbasen.**

Es wurden in allen Fällen geringe Mengen der in Untersuchung gezogenen Substanzen oxydirt, der Harnstoff durch Schütteln mit Bromlauge vollkommen entfernt, das überschüssige Brom durch Kochen mit Salzsäure ausgetrieben, die durch Phosphorwolframsäure hervorgerufenen Niederschläge gesammelt, ausgewaschen und getrocknet.

Der auf diese Weise gewonnene Phosphorwolframsäureniederschlag des Eieralbumins wurde mit Aetzbaryt gekocht, Kohlensäure eingeleitet, heiss filtrirt und mit Quecksilberchlorid im Ueberschuss bis zur sauren Reaction versetzt. Es resultirte ein geringer Niederschlag. Derselbe wurde im Wasser suspendirt, Schwefelwasserstoff eingeleitet, filtrirt und eingedampft. In den in geringer Menge gewonnenen Krystallen von Histidinchlorid wurde eine Chloridbestimmung ausgeführt.

0,068 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet,  
gaben 0,0471 g  $\text{AgCl}$ .

Berechnet für:

Gefunden:

$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_4\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$

Cl 16,90%

17,9%.

Die Versuche, nach Kossel und Hedin Arginin als Silberdoppelsalz zu fällen, blieben resultatlos. Es wurde daher von Neuem mit Phosphorwolframsäure gefällt, gekocht, der Baryt mit Schwefelsäure abgeschieden, die jetzt freie Basenlösung stark eingeengt und alkoholische Pikrinsäurelösung zugesetzt. Nach einigem Stehen fallen feine Krystallnadeln aus, die später derberen Charakter annehmen. Die Krystalle wurden nach mehreren Tagen mit heissem Wasser umkrystallisirt. Hierauf wurden die Krystalle mit verdünnter

hydrat der Basen. Die wässrige Lösung wurde abgedampft, mit Methylalkohol aufgenommen, filtrirt, wieder aufgenommen, stark eingengt und mit concentrirter Platinchloridlösung und Alkohol versetzt. Nur Lysin fällt als Platinat. Es resultirten rothgelbe Prismen, welche mit einem als Vergleichsobject benutzten Lysinplatinchloridpräparate nahezu gleichen Schmelzpunkt zeigten. Die Krystalle wurden bei ca. 120° getrocknet und der Platingehalt bestimmt.

Filter sammt Glas ohne Niederschlag:	25,6241 g
„ „ „ mit „	25,6885 „
	0,0644 g

Tiegel ohne:	11,2405 g
„ mit:	11,2632 „
	0,0227 g

Berechnet für:	Gefunden:
$C_6H_{14}N_2O_2, 2HCl, PtCl_4$	
Pt 35,05 %	35,25 %.

Die Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlags mit Millon'schem Reagens ergibt ein negatives Resultat, was für die Abwesenheit der tyrosinbildenden Gruppe spricht.

### Krystallisirtes Serumglobulin (aus Pferdeblut).

Das Blutserum wurde nach der Vorschrift von Reye<sup>1)</sup> von Fibrinogen getrennt und zwar wurden im Sinne des Vorschlages von Hausmann<sup>2)</sup> auf 2 Vol. Serum 5 Vol. Wasser und 3 Vol. gesättigte Ammonsulfatlösung verwendet. Nach Versetzen des Filtrates mit einer nahezu halbgesättigten Ammonsulfatlösung fällt das Globulin aus. Dasselbe wurde in Wasser gelöst, neuerdings mit Ammonsulfat gefällt, hierauf nach Hofmeister bis zur Abscheidung von Globuliten verdunsten gelassen und die weiteren Operationen so durchgeführt, wie ich dieselben beim krystallisirten Eialbumin angegeben habe.

1) W. Reye, Ueber Nachweis und Bestimmung des Fibrinogens. Dissertation, Strassburg, 1898.

2) Zeitschr. f. phys. Chemie, Bd. XXVII, S. 102.

### **Analytischer Theil.**

0,2648 Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,0422 g Stickstoff, entsprechend 15,94%.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5028 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

#### **I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.**

50 ccm. der Lösung = 0,05028 g Substanz lieferten 5,40 ccm. Stickstoff bei 20° C. und 748 mm. B = 6,0637 mg Stickstoff = 12,06% Stickstoff.

#### **II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.**

200 ccm. der Lösung = 0,20112 g Substanz lieferten 0,0899 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02413 g Stickstoff, entsprechend 12,00% Stickstoff.

#### **III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.**

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,20112 g Substanz lieferte 0,00790 g Stickstoff, entsprechend 3,93% Stickstoff.

#### **IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Serumglobulin gewonnenen Harnstoffes.**

Zu diesem Zwecke wurden wiederholt Mengen von ca. 0,5 g Serumglobulin oxydirt, die Niederschläge von oxalsaurem Harnstoff gesammelt und einer Analyse unterzogen.

a) 0,1982 g Substanz lieferten 0,1679 g CO<sub>2</sub> und 0,0877 g H<sub>2</sub>O  
(CON<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>2</sub>.    Berechnet C 22,86%, H 4,76%  
   Gefunden C 23,10%, H 4,91%.

b) Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl.

0,0899 g Substanz lieferten 0,02413 g Stickstoff.

Berechnet Stickstoff 26,66%; gefunden 26,84%.

#### **Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.**

Nach dem bereits beim Eieralbumin beschriebenen Verfahren konnte in dem in grösseren Mengen gesammelten Phosphorwolframsäureniederschlag Arginin, Histidin und Lysin qualitativ nachgewiesen werden. Bezüglich der Identificirung



unrein erwiesen hat, in einer zweiten Probe in das Argininkupferniträt übergeführt. Die Krystalle schmelzen bei ca. 114°; der Schmelzpunkt eines reinen Argininkupferniträts liegt nach Schulze bei 112 bis 113°. Die Kupferbestimmung des über Chlorcalcium getrockneten Salzes ergab folgende Zahlen:

Filter sammt Glas ohne Niederschlag:	25,6084 g	
» » » mit »	25,6865 »	
		0,0781 g
Tiegel ohne:	11,30680 g	
» mit:	11,31751 »	
		0,01071 g CuO.
Berechnet für		Gefunden:
$(C_6H_{14}N_4O_2)_2 Cu(NO_3)_2 + 3 H_2O$		
Cu 10,77		11,04 %.

### Krystallisirtes Serumalbumin.

Dargestellt aus Pferdeblutserum nach Gürber.<sup>1)</sup>

Die erhaltenen Krystalle wurden in Wasser gelöst, durch Dialyse von anhaftendem Ammonsulfat möglichst befreit und aus der erhaltenen Lösung das Serumalbumin durch Alkohol und Kochen gefällt, mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und bei ca. 105° C. getrocknet.

#### Analytischer Theil.

0,2546 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,04084 g Stickstoff, entsprechend 16,04 % Stickstoff.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5108 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

#### I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,05108 g Substanz lieferten 5,84 ccm. N bei 18° C. und 750 mm. B = 6,645 mg N = 13,01 % N.

1) Siehe: Zur Kenntniss der Gürber'schen Serumalbuminkrystalle, von Dr. A. Michel, nebst einem Nachtrag von Dr. A. Gürber. Verlag der Stahel'schen Hof- und Universitäts-Buchhandlung. Würzburg, 1895. Ferner: Hans Krieger, Ueber die Darstellung krystallinischer Eiweissstoffe, Dissertation, 1899.

200 ccm. der Lösung = 0,20432 g Substanz lieferten 0,0556 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,0265 g N, entsprechend 12,97% N.

### III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,20432 g Substanz lieferte 0,00649 g N = 3,18% N.

### IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Serumalbumin gewonnenen Harnstoffes.

Geringe Mengen von Serumalbumin wurden wiederholt in oxalsauren Harnstoff übergeführt, die Niederschläge gesammelt, im Exsiccator bis zum constanten Gewichte getrocknet und ein aliquoter Theil der Verbrennungsanalyse unterworfen.

0,2016 g gaben 0,1716 g  $\text{CO}_2$  und 0,0896 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Berechnet für  $(\text{CON}_2\text{H}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ :

C 22,86%

H 4,76%

Gefunden:

23,23%

4,95%.

### Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Nach dem bereits beim Eieralbumin ausführlich beschriebenen Verfahren konnte Histidin in Form von Histidin-chlorid-Krystallen abgeschieden werden.

0,071 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gaben 0,0490 AgCl.

Berechnet für  $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_4\text{HCl} + \text{H}_2\text{O}$ :

Cl 16,90%

Gefunden:

17,7%.

Arginin konnte als Silberdoppelsalz nur in vereinzelt Krystallen erhalten werden, so dass eine nähere Identificirung nicht möglich war. Lysin wurde als Platinat gefällt. Die Krystalle wurden bei ca. 120° C. getrocknet und der Platingehalt bestimmt.

Filter sammt Glas ohne Niederschlag: 26,0849

» » » mit » : 26,1447

0,0598

Tiegel ohne: 11,1862

» mit: 11,2075

0,0213

## Krystallisirtes Oxyhämoglobin (vom Pferde).

Dargestellt nach Hoppe-Seyler. (Bezogen von Grüber.)

### Analytischer Theil.

0,1423 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,02406 g N, entsprechend 16,91 %.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,4911 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

### I. Volumetrische Stickstoffbestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,04911 g Substanz lieferten 6,60 ccm. N bei 18° und 758 mm. B = 7,582 mg N = 15,44 % N.

### II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,19644 g Substanz lieferten 0,0532 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,03031 g N, entsprechend 15,43 % N.

### III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,19644 g Substanz lieferte 0,00295 g N = 1,5 % N.

### IV. Identificirung des durch Oxydation aus dem Oxyhämoglobin gewonnenen Harnstoffes.

0,1784 g gaben 0,1511 g CO<sub>2</sub> und 0,0787 g H<sub>2</sub>O.

Berechnet für (CON<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>2</sub>

C 22,86 %

H 4,76 %

Gefunden:

23,11 %

4,90 %.

### Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Wegen Mangels an Ausgangsmaterial musste ich vorläufig von der Untersuchung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen Abstand nehmen.



0,0874 g  $C_2H_2O_4$ .

Berechnet  $C_2H_2O_4$  42,86 %; gefunden 43,35 %.

#### **Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlags auf Hexonbasen.**

Zur Identificirung der Hexonbasen wurde der Phosphorwolframsäureniederschlag in gleicher Weise behandelt, wie es bei dem Eialbumin eingehend angegeben wurde. Auch hier konnte Histidin und Lysin nachgewiesen werden. Was den Nachweis des Arginins betrifft, so wurde das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage zunächst vom Quecksilber und von der Salzsäure befreit und hierauf behufs Ausfällung des Arginins Silbernitrat und Barytwasser hinzugefügt. Es resultirte ein minimaler Niederschlag; derselbe wurde durch Schwefelwasserstoff zerlegt, das Filtrat mit Salpetersäure neutralisirt und vorsichtig eingedampft. Nach einigem Stehen fielen einzelne feine Nadeln aus, die unter dem Mikroskope die gleiche Krystallisation erkennen liessen, wie ein zum Vergleiche herangezogenes reines Argininnitrat. Weitere Identificirungen habe ich in Anbetracht der enormen Zeitinanspruchnahme, welche die Gewinnung eines genügend grossen Phosphorwolframsäureniederschlags beansprucht haben würde, nicht gemacht, so dass der exacte Nachweis des Arginins in dieser Fraction noch aussteht. Jedenfalls ist durch die Versuche die Anwesenheit von Hexonbasen im Phosphorwolframsäureniederschlage des Caseins nach der Oxydation constatirt worden.

Mit Millon'schem Reagens gab der Phosphorwolframsäureniederschlag keine Reaction.

#### **Fibrin.**

Frisches Ochsenblut wurde mit Reisigbündel geschlagen, die Masse längere Zeit mit Wasser gewaschen, bis sie beinahe weiss ist, sodann mit einer 5%igen Kochsalzlösung und dann wieder mit Wasser so lange gewaschen, bis sie absolut frei von Kochsalz war. Hierauf wurde das Produkt mit Alkohol und dann mit Aether extrahirt.

### **Analytischer Theil.**

0,2491 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,04085 g N, entsprechend 16,64% N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,6028 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

#### **I. Volumetrische Bestimmung.**

50 ccm. der Lösung = 0,06028 g Substanz lieferten 3,95 ccm. N bei 18° C. und 758 mm. B = 4,533 mg N = 7,52% N.

#### **II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.**

200 ccm. der Lösung = 0,24112 g Substanz lieferten 0,0679 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,01823 g N, entsprechend 7,56% N.

#### **III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.**

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,24112 g Substanz lieferte 0,0986 g N, entsprechend 4,09% N.

#### **IV. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages.**

Das Filtrat aus 200 ccm. der Lösung = 0,24112 g Substanz lieferte 0,1178 g N, entsprechend 4,87% N.

#### **V. Identificirung des durch Oxydation aus dem Fibrin gewonnenen Harnstoffes.**

Die Analyse des aus einer grossen Reihe von Oxydationsversuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Werthe:

0,2604 g Substanz lieferten 0,2214 g CO<sub>2</sub> und 0,1108 g H<sub>2</sub>O.  
(CON<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>2</sub>.    Berechnet C 22,86%, H 4,76%  
   Gefunden C 23,20%, H 4,72%.

#### **Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.**

Der aus zahlreichen Oxydationsversuchen gesammelte Niederschlag wurde mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, bis das Filtrat nur Spuren von Salzsäure enthielt. Hierauf wurde der Niederschlag mit reiner Kalkmilch unter Zusatz von etwas Barytwasser zerlegt, Kohlensäure eingeleitet, filtrirt, das

der Methode von Hedin (Zeitschrift für physiol. Chemie, Bd. XXI, S. 166—168) mit Silbernitrat gefällt. Es resultirte ein geringer Niederschlag von 0,074 g basischem Argininsilbernitrat ( $C_6H_{14}N_4O_3 \cdot AgNO_3 + \frac{1}{2}H_2O$ ).

Die quantitative Silberbestimmung ergab 0,0290 g Ag.

Berechnet 30,59 %; gefunden 30,94 %.

Zum Nachweise von Histidin und Lysin wurde eine frische Probe des Phosphorwolframsäureniederschlages mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, mit Barythydrat zerlegt, Kohlensäure eingeleitet, filtrirt und das Filtrat mit Quecksilberchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen wurde der geringe Niederschlag filtrirt, ausgewaschen, in Wasser vertheilt und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde auf dem Wasserbade stark eingeengt und längere Zeit stehen gelassen. Es schieden sich Krystalle von Histidin ab, jedoch reichte die Menge nur zu einer Chlorbestimmung aus.

0,052 g Substanz, über Schwefelsäure getrocknet, gab 0,036 g AgCl.

Berechnet für  
 $C_6H_9N_3O_3 \cdot HCl + H_2O$   
Cl 16,90 %

Gefunden:  
  
17,16 %.

Das Filtrat vom Quecksilberchloridniederschlage wurde zunächst durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber und durch Silbernitrat von der Salzsäure befreit, und das Arginin nach Kossel durch Ausfällen mit Silberlösung und Barytwasser entfernt. Der durch diese Reagentien hervorgerufene geringe Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat mit Phosphorwolframsäure versetzt. Nach Zerlegung des Phosphorwolframsäureniederschlages durch Baryt und Entfernung des Baryts durch Kohlensäure, wurde das Filtrat auf dem Wasserbade stark eingeengt und hierauf mit alkoholischer Pikrinsäurelösung versetzt. Nach mehrstündigem Stehen fielen feine gelbe Nadeln von Lysin pikrat aus. Dieselben wurden nach Kossel's Vorschrift durch Schütteln mit wässriger Salzsäure und Aether in das Chlorhydrat übergeführt. Die wässrige

Lösung wurde eingedunstet, der Verdampfungsrückstand mit Methylalkohol behandelt, filtrirt, wieder abgedampft, der Rückstand in wenig Wasser gelöst, und die Flüssigkeit mit einer concentrirten Platinchloridlösung versetzt. Nach mehrtägigem Stehen fielen gelbrothe Prismen aus. Die Krystalle wurden bei ca. 120° C. getrocknet und eine quantitative Platinbestimmung durchgeführt.

0,0481 g Substanz gaben 0,0170 g Pt.

Berechnet für  
 $C_6H_{14}N_2O_8, 2HCl, PtCl_4$   
Pt 35,05 %

Gefunden:

35,45 %

### Vitellin aus Eigelb.

Dieses Albumin wurde aus Eigelb von Hühnereiern in der Weise dargestellt, dass der Eidotter zunächst mit Alkohol und Aether und hierauf mit Wasser extrahirt wurde. Der Rückstand stellt das Vitellin aus Eigelb dar.

#### Analytischer Theil.

0,2602 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,03981 g N, entsprechend 15,30 % N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,5864 g, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

#### I. Volumetrische Bestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,05864 g Substanz lieferten 6,15 ccm. N bei 18° C. und 756 mm. B = 7,06 mg N = 12,04 % N.

#### II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,23456 g Substanz lieferten 0,10498 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02805 g N, entsprechend 11,96 % N.

#### III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlag.

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,23456 g Substanz lieferte 0,00753 g N, entsprechend 3,21 % N.



Die Analyse des aus einer grösseren Anzahl von Oxydationsversuchen gewonnenen Oxalates ergab folgende Resultate:

0,2369 g Substanz lieferten 0,2009 g  $\text{CO}_2$  und 0,1056 g  $\text{H}_2\text{O}$ .  
 $(\text{CON}_2\text{H}_4)_2 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ . Berechnet C 22,86 %, H 4,76 %  
 Gefunden C 23,27 %, H 4,95 %.

#### Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlags auf Hexonbasen.

Nach dem beim krystallisirten Eialalbumin beschriebenen Verfahren gelang es, im Phosphorwolframsäureniederschlage Histidin in Form von Histidinchloridkrystallen und Lysin als Lysinplatinchlorid abzuscheiden. Hingegen blieben die Versuche, Arginin nachzuweisen, resultatlos. Ich behalte mir vor, an einem grösseren Ausgangsmaterial die Versuche zu wiederholen und später darüber zu berichten.

#### Vitellin aus Pflanzen.

(Bezogen von Grüber.)

0,2008 g Substanz lieferten nach Kjeldahl 0,0355 g N, entsprechend 17,68 % N.

Zur Oxydation verwendete Menge 0,6142 g Substanz, das Oxydationsprodukt wurde auf 500 ccm. aufgefüllt.

#### I. Volumetrische Bestimmung.

50 ccm. der Lösung = 0,06142 g Substanz lieferten 4,46 ccm. N bei 20° C. und 749 mm. B = 5,024 mg N = 8,18 % N.

#### II. Stickstoffbestimmung im oxalsauren Harnstoff nach Kjeldahl.

200 ccm. der Lösung = 0,24568 g Substanz lieferten 0,0670 g oxalsauren Harnstoff. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl ergab 0,02938 g N, entsprechend 11,96 % N.

#### III. Stickstoffbestimmung im Phosphorwolframsäureniederschlage.

Der Niederschlag aus 200 ccm. der Lösung = 0,24568 g Substanz lieferte 0,00793 g N, entsprechend 3,23 % N.

#### IV. Stickstoffbestimmung im Filtrate des Phosphorwolframsäureniederschlages.

Das Filtrat aus 200 ccm. der Lösung = 0,24568 g Substanz lieferte 0,01521 g N, entsprechend 6,19 % N.

#### V. Identificirung des durch Oxydation aus dem Vitellin aus Pflanzen gewonnenen Harnstoffes.

0,2514 g Substanz lieferten 0,2110 g CO<sub>2</sub> und 0,2110 g H<sub>2</sub>O.  
(CON<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) · C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>2</sub>. Berechnet C 22,86 %, H 4,76 %  
Gefunden C 23,27 %, H 4,94 %.

#### Prüfung des Phosphorwolframsäureniederschlages auf Hexonbasen.

Es gelang, nach dem beim Fibrin ausführlich beschriebenen Verfahren Arginin als basisches Argininsilbernitrat, Histidin in Form von Histidinkrystallen und Lysin als Lysinplatinchlorid abzuscheiden. Ich habe speciell beim Vitellin, welches mir in genügender Quantität zur Verfügung stand, das Auftreten der Hexonbasen nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ verfolgt und behalte mir vor, über diese Ergebnisse an anderer Stelle zu berichten.

#### Folgerungen aus den Resultaten.

Aus der tabellarischen Zusammenstellung der analytischen Daten ergibt sich die Eintheilung der bis jetzt beobachteten Eiweisskörper in drei Typen:

##### I. Oxyhämoglobin.

Harnstoff-N über 90 % des Gesamtstickstoffes, der Rest im Phosphorwolframsäureniederschlage.

##### II. Eieralbumin, Serumalbumin, Serumglobulin, Casein, Vitellin aus Eigelb.

Harnstoff-N 70 bis 81 %, der Rest im Phosphorwolframsäureniederschlage.

##### III. Fibrin, Vitellin aus Pflanzen.

Harnstoff-N 40 bis 50 %, Filtratstickstoff ca. 30 %, der Rest im Phosphorwolframsäureniederschlage.

Mit Ausnahme der ersten Gruppe schwankt der Stickstoff im Phosphorwolframsäureniederschlage zwischen 18 bis 30 %.

Aus diesen Zahlen ergeben sich erhebliche Unterschiede in der Zusammensetzung der Eiweisskörper. Die nächste Auf-

Tabellarische Zusammenstellung der analytischen Daten.

	Gesamtnitrogen	Volnmetrischer Stickstoff	Harnstoffstickstoff	Stickstoff im Phosphorwolframschläge	Filtratstickstoff	In Procenten des Gesamtnitrogen			
						Volnmetrischer Stickstoff	Harnstoffstickstoff	Phosphorwolframschläge	Filtratstickstoff
Unlösliches Eiweißalbumin	14,98	11,86	11,80	3,12	—	79,17	78,77	20,82	—
Lösliches Serumglobulin	15,94	12,06	12,00	3,93	—	75,65	75,28	24,65	—
Lösliches Serumalbumin	16,04	13,01	12,97	3,18	—	81,10	80,86	19,82	—
Hämoglobin	16,91	15,44	15,43	1,50	—	91,30	91,24	8,87	—
.....	15,30	11,20	11,12	3,90	—	73,20	72,67	25,49	—
.....	16,64	7,52	7,56	4,09	4,87	45,19	45,43	24,57	24,62
..... aus Eiweiß ..	15,30	12,04	11,96	3,21	—	78,69	78,16	20,98	—
..... aus Pflanzen ..	17,68	8,18	8,22	3,23	6,19	46,26	46,44	18,32	35,01

gabe ist nun die, durch Vervollständigung obiger Daten festzustellen, ob das Eintheilungsprinzip noch einer Modification bedarf, und inwieweit diese chemische Eintheilung mit den sonstigen chemischen und physiologischen Eigenschaften der Eiweisskörper in Beziehung zu bringen ist. Die geringe Differenz zwischen dem volumetrisch entwickelten Stickstoff (Harnstoff, Ammoniak) und dem nach der Oxalsäurefällung erhaltenen Stickstoff (nur Harnstoff) lässt ersehen, dass Ammoniak unter den eingehaltenen Oxydationsbedingungen nur spurenweise erhalten wird. Hiermit soll keineswegs behauptet werden, dass die Harnstoff bildenden Gruppen nicht bei anderer Behandlung (Kochen mit Säuren oder Basen) ebenso quantitativ in Ammoniak übergeführt werden. Vor der Hand sei nur auf die nahe Uebereinstimmung des Harnstoffstickstoffes nach meinem Verfahren und der Summe des Amid- und Monaminostickstoffes nach Hausmann (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 104) hingewiesen.

In allen Fällen konnte die Anwesenheit von Hexonbasen im Phosphorwolframsäureniederschlag constatirt werden. Hingegen ergab die Prüfung auf Tyrosin ein negatives Resultat.

### Die Ueberführung der Eiweisskörper in Harnstoff.

Es ist in der beschriebenen Versuchsanordnung ein Weg gefunden, von den Eiweisskörpern zu demselben Endprodukte zu gelangen, welches als Endglied der Umsetzungen im Organismus resultirt, zum Harnstoff. Hiermit soll durchaus nicht behauptet werden, dass in beiden Fällen die Zwischenstadien des Processes die nämlichen sind, wenn auch hier wie dort die Harnstoffbildung der Abschluss der Eiweisspaltung ist. Im Organismus können wir uns die Entstehung des Harnstoffes erklären, indem wir annehmen, dass er durch hydrolytische Spaltung aus ureidartigen Körpern gebildet wird, die ihrerseits bei der Oxydation des Eiweisses entstehen, oder wir können diese beiden Processe (Oxydation und Hydrolyse) uns gleichzeitig verlaufend vorstellen. Schliesslich ist noch eine Erklärung zulässig, die zunächst eine Oxydation des Eiweisses zu Kohlensäure und Ammoniak annimmt, aus denen synthetisch Harnstoff entsteht. Zum Mindesten erscheint der letztgenannte

scheinlich, während über die grössere Möglichkeit eines der anderen Wege keine Entscheidung getroffen werden kann.

Die Ueberführbarkeit eines grossen Theiles des Stickstoffes in Harnstoff, während der Rest in Form von Verbindungen auftritt, welche durch Phosphorwolframsäure fällbar sind, ist eine Eigenschaft, welche sämtliche Eiweissstoffe charakterisirt. Inwieweit die übrigen am Stoffwechsel beteiligten Produkte ein analoges Verhalten zeigen, bedarf noch der Untersuchung; vielleicht ist nach dieser Richtung hin eine Abgrenzung des Begriffes «Proteinkörper» möglich.

An dieser Stelle möge darauf hingewiesen werden, dass abgesehen von den früheren weniger beweiskräftigen Arbeiten zuerst von Hofmeister<sup>1)</sup> in sicherer Weise das Auftreten von Harnstoff bei der Oxydation verschiedener stickstoffhaltiger und stickstofffreier Substanzen in ammoniakalischer Lösung durch Kaliumpermanganat beobachtet worden ist. Mit dieser an sich wichtigen Thatsache stehen die von mir erhaltenen Resultate in keinem Zusammenhange:

Erstens ist die Harnstoffbildung bei den Hofmeister'schen Versuchen, besonders bei den stickstofffreien Substanzen sicher durch die gleichzeitige Anwesenheit des Ammoniaks bedingt, und somit der Harnstoff nicht im strengen Sinne als ein Spaltungsprodukt der untersuchten Körper aufzufassen, sondern er entsteht durch die Reaction des Ammoniaks auf die leider nicht leicht fassbaren Spaltungsprodukte der von Hofmeister in Untersuchung gezogenen Substanzen.

Zweitens ist die Menge des Harnstoffes nach Hofmeister in keinem Falle auch nur annähernd so gross, dass man von einer quantitativen Reaction sprechen kann. Es kann natürlich nicht entschieden werden, inwieweit die Reaction im Organismus vollständiger verläuft, als bei den Hofmeister'schen Reactionen. Jedenfalls sprechen die quantitativen Verhältnisse dagegen, die Oxydation in alkalischer Lösung als einen glatt verlaufenden Process zu betrachten.

<sup>1)</sup> Ueber Bildung des Harnstoffes durch Oxydation. Von Franz Hofmeister, Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie Bd. XXXVII, S. 426.

Drittens vermögen die Versuche von Hofmeister, so interessant sie auch bezüglich der synthetischen Bildung des Harnstoffes sind, keineswegs klarzustellen, woher der Stickstoff des Harnstoffes stammt, und welches die Bedingungen der Ueberführbarkeit des Stickstoffs in Harnstoff sind. Dieses vorwiegend analytische Problem lässt sich bei den Hofmeister'schen Versuchen, eben in Folge des Ammoniaküberschusses nicht lösen, während auf dem von mir eingeschlagenen Wege in Folge der Abwesenheit anderer stickstoffhaltiger Substanzen und der hierdurch erleichterten quantitativen Durchführung der Versuche der Uebergang des Stickstoffes der Eiweisskörper in Harnstoff quantitativ verfolgt werden konnte.

### Ueber die Eiweissoxydation im Organismus.

Die Spaltung der im Organismus vorkommenden organischen Substanzen kann nach zwei Richtungen erfolgen. Erstens, die hydrolytische Spaltung, welche, da ja Wasser überall in genügender Menge zur Verfügung steht, im Wesentlichen von der Anwesenheit von Fermenten oder katalytisch wirkenden Substanzen abhängt. Zweitens, die oxydative Spaltung, welche von der Sauerstoffzufuhr bedingt ist. Durch hydrolytische Spaltung allein lässt sich der Zerfall der Eiweisskörper bis zum Harnstoff nicht erklären, da aus der Zusammensetzung der Eiweisskörper folgt, dass bei der Abspaltung des Stickstoffes in Form des Harnstoffes der übrig bleibende Rest sehr sauerstoffarm ist — auf 1 Atom Sauerstoff ca. 5 Atome Kohlenstoff. — Thatsächlich wird aber der grösste Theil des Kohlenstoffes des Eiweisses aus dem Organismus in Form von Kohlensäure ausgeschieden, so dass hieraus hervorgeht, dass wir mindestens in einem Stadium des Processes eine Oxydation annehmen müssen. Diese Anschauung ist übrigens vollständig evident, wenn man die Gesamtbilanz des Stoffwechsels, speciell hinsichtlich der Athmung, zieht und überdies berücksichtigt, dass man bei ausschliesslicher Eiweisskost gleichzeitig Harnstoff und Kohlensäure ausscheidet. Andererseits ist zu erwägen, dass im Eiweiss fast keine freien Amidogruppen vorhanden sind. Die Amidogruppen des Harnstoffes lassen sich nur dadurch erklären, dass durch eine hydrolytische

Grund dieser Erwägung muss für den Zerfall der Eiweisskörper im Organismus sowohl eine hydrolytische, als eine oxydative Spaltung angenommen werden. — Ueber die Reihenfolge dieser Vorgänge lassen sich keine bestimmten Aussagen machen; es ist nicht unwahrscheinlich, dass in den ersten Stadien des Processes die hydrolytische Spaltung eine wesentliche Rolle spielt, da die Eiweisskörper im Allgemeinen nach dieser Richtung hin zerlegbar sind. Bezüglich der Oxydation der Eiweisskörper im Organismus lassen sich aus der Betrachtung der Stoffwechselprodukte einige Schlüsse ziehen. Wir wissen, dass bei ausschliesslicher Eiweissnahrung der überwiegende Theil des zugeführten Stickstoffes durch die Nieren als Harnstoff, der Haupttheil des Kohlenstoffes als Kohlensäure durch die Lungen ausgeschieden werden. Wir sehen also im Wesentlichen als Endprodukte der Oxydation Kohlensäure und Harnstoff, von welchem letzterem bei der Spaltung mit Permanganat ebenfalls sehr beträchtliche Mengen erhalten werden. Wenn im Organismus die Oxydation in Folge von pathologischen Veränderungen abnormal verläuft, oder wenn die zugeführte Sauerstoffmenge zur Oxydation der gesammten zugeführten Nahrung nicht ausreicht, so werden anstatt dieser Endprodukte Zwischenprodukte der Oxydation in relativ beträchtlicher Menge ausgeschieden, unter welchen z. B. zu nennen sind: Harnsäure, Xanthinbasen, Fettsäuren etc.

### Ueber die Stickstoffbindung der Eiweisskörper.

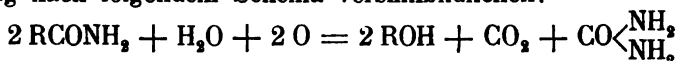
Ausgehend von Versuchen in der Harnsäurereihe, die das Ergebniss geliefert haben, dass bei entsprechender Oxydation gewisser stickstoffhaltiger Körper der ganze Stickstoff oder ein von der Constitution abhängiger Bruchtheil desselben in Harnstoff übergeht, habe ich versucht, festzulegen, welches die Bedingungen für diese Reactionen sind. Als Ergebniss der zu diesem Zwecke unternommenen Arbeiten lassen sich bis jetzt folgende Regeln zur Harnstoffbildung aussprechen:

Der Harnstoff entsteht aus der  $\text{CONH}_2$ - resp.  $\text{CONH}$ -Gruppe. Beispiele hierfür sind — abgesehen von dem ziemlich

selbstverständlichen Verhalten der Ureide — die Purinbasen,<sup>1)</sup> Hippursäure,<sup>2)</sup> Asparagin,<sup>3)</sup> Lactamid, Succinamid, Benzoylasparaginsäure.<sup>4)</sup> Bei allen diesen Körpern tritt ebenso viel Stickstoff in Form von Harnstoff aus, als  $\text{CONH}_2$ - resp.  $\text{CONH}$ -Gruppen vorhanden sind. So geben z. B. die methylierten Purinkörper den Stickstoff der  $\text{CONCH}_3$ -Gruppen nicht in Form von Harnstoff ab, ebensowenig wie die Amidosäuren Glycocoll, Asparaginsäure Harnstoff liefern. Das Asparagin z. B., welches von zwei Stickstoffen einen in der Säure-Aminogruppe enthält, gibt genau die Hälfte des Stickstoffes als Ammoniak ab, die andere Hälfte als Harnstoff.

Ob eine  $\text{CONH}$ -Gruppe befähigt ist, Harnstoff zu liefern, hängt im Wesentlichen von der leichten Oxydirbarkeit des Complexes ab, an dem sie hängt, und ferner auch von der Structur dieses Restes.

Obzwar der eigentliche Mechanismus der Reaction noch nicht hinlänglich aufgeklärt ist, so kann man sich den Vorgang nach folgendem Schema versinnbildlichen:



Hierbei ist unter R jene Gruppe resp. jener Theil des Gesamtmoleküls zu verstehen, an dem die  $\text{CONH}$ -Gruppe hängt.

Selbstverständlich kann die Oxydation des Körpers ROH — der einen Alkohol oder eine Säure vorstellt — noch weiter gehen, was auf die Reaction bezüglich des Harnstoffes irrelevant ist, und ich kann für die Richtigkeit dieses Theiles der Reactions-gleichung keineswegs eintreten. Nachdem nun an dem vorliegenden Materiale festgestellt worden war, dass die  $\text{CONH}$ -Gruppe und keine andere befähigt sei, bei der Oxydation unter bestimmten Bedingungen Harnstoff zu liefern, habe ich eine Reihe von Eiweisskörpern derselben Behandlung unterzogen,

1) Ueber eine quant. Reaction bei den Ureiden und Purinderivaten. Von Adolf Jolles, Berichte XXXIII, S. 1246 und 2119.

2) Ueber die Oxydation der Hippursäure zu Harnstoff. Von Adolf Jolles, Berichte XXXIII, S. 2834.

3) Zur Kenntniss des Asparagins und der Asparaginsäure. Von Adolf Jolles, Berichte XXXIV, S. 386.

4) Ueber den Harnstoff als Produkt der Oxydationsspaltung stickstoffhaltiger Körper. Von Adolf Jolles, Journal f. prakt. Chemie.



moleküle ziehen zu können. Die Untersuchungen, deren Einzelresultate im experimentellen Theile ausführlich wiedergegeben sind, haben ausnahmslos sehr bedeutende Bruchtheile des Eiweisstickstoffes in Form von Harnstoff ergeben, immer über 45%, bei gewissen Eiweisskörpern bis 90%. Aus diesen Untersuchungen geht hervor, dass im Eiweiss beträchtliche, ja selbst überwiegende Antheile des Stickstoffes in harnstoffbildenden Gruppen stehen. Nach den bisherigen Erfahrungen können wir nicht umhin, als diese Gruppen die CONH-Gruppen aufzufassen. Wir müssen somit im Eiweiss eine beträchtliche Zahl von CONH-Gruppen annehmen. Es fragt sich jetzt noch, womit diese Gruppen verbunden sind. Betrachtet man das Verhältniss von Stickstoff und Kohlenstoff im gesammten Eiweissmolekül, so sieht man, dass auf 1 Atom Stickstoff ca. 4 Atome Kohlenstoff entfallen, so dass nach Abspaltung von CONH-Gruppen ein kohlenstoffreicher Rest übrig bleiben wird. Inwieweit dieser auf Phenole, Fettsäuren etc. entfällt, ist in quantitativer Weise noch nicht untersucht worden. Nachdem bisher die Harnstoffbildung nur bei jenen CONH-Gruppen constatirt werden konnte, deren Träger ein leicht oxydabler Complex ist, so müssen wir auch hier annehmen, dass der Rest, an dem die CONH-Gruppe stand, einer weiteren Oxydation anheimfällt. Inwieweit diese Oxydation mit Permanganat bei Eiweisskörpern zu Ende geführt wird, habe ich bis jetzt noch nicht untersucht.

Nachdem bei der Oxydation der Eiweisskörper immer ein, wenn auch zuweilen geringer, Antheil des Stickstoffes nicht als Harnstoff auftritt, und ferner für die von Kossel als Kern des Eiweisses angenommenen Hexonbasen, ebenso wie für die nicht mit dem Harnstoff identischen stickstoffhaltigen Spaltungsprodukte des Eiweisses die Fällbarkeit durch Phosphorwolframsäure nachgewiesen ist, so können wir annehmen, dass der Eiweisstickstoff, soweit er nicht als Harnstoff auftritt, im Wesentlichen in Form von Hexonbasen abgespalten wird. In dieser Beziehung bieten die Oxydationsversuche, wobei im Phosphorwolframsäureniederschlag die Hexonbasen allerdings nur qualitativ nachgewiesen wurden, eine Stütze für die Kossel'sche Theorie. Wenngleich aber nachgewiesen ist,

dass dieser Hexonkern sämtlichen Eiweisskörpern gemeinsam ist, und selbst wenn zugegeben wird, dass der chemische Charakter des Eiweisses dadurch bedingt ist, so muss doch hervorgehoben werden, dass keineswegs dargethan ist, dass dieser Kern für die Ernährung ausschlaggebend ist. Es ist viel eher anzunehmen, dass die harnstoffbildende Gruppe, die allen Eiweisskörpern, und zwar in viel grösseren Antheilen gemeinsam ist, für die Functionen des Eiweisses als Nahrungsstoff von grösster Wichtigkeit ist.

Diese Fragen werden sich erst durch eine sehr ausgedehnte chemische und physiologische Vergleichung der Eiweisskörper unter einander beantworten lassen, und es sei zunächst nur nochmals darauf hingewiesen, dass sich unter den Eiweisskörpern erhebliche Differenzen bezüglich der gebildeten Harnstoffmengen gezeigt haben, was für die Charkterisirung der einzelnen Glieder dieser Körperreihe von grossem Interesse ist. Die Analogie, welche sich in gewisser Beziehung zwischen der Permanganatoxydation und der physiologischen Verarbeitung der Eiweisskörper gezeigt hat, wird besonders durch diese Versuchsergebnisse bekräftigt, worüber nach Abschluss der bezüglichen Nährversuche berichtet werden soll.

#### **Zusammenstellung der Resultate.**

I. Bei der Oxydation von Eiweisskörpern in saurer Lösung mit Permanganat tritt der Stickstoff in folgenden Formen auf:

- a) Harnstoff,
- b) durch Phosphorwolframsäure fällbare Substanzen,
- c) Filtratstickstoff.

Ammoniak tritt nur in Spuren auf.

Der Harnstoff kann nicht aus Hexonbasen entstanden sein, nachdem diese bei der angegebenen Behandlung keinen Harnstoff liefern, und ausserdem ihre Menge nicht ausreicht, die gesammte Harnstoffbildung zu erklären. — Hexonbasen finden sich im Phosphorwolframsäureniederschlage.

II. Auf Grund der Resultate lassen sich folgende unter einander stark abweichende Typen aufstellen:

als Harnstoff ab.

b) Krystallisirtes Eieralbumin, krystallisirtes Serumalbumin, krystallisirtes Serumglobulin, Casein, Vitellin aus Eigelb lieferten 70 bis 81% Stickstoff als Harnstoff.

c) Fibrin und Vitellin aus Pflanzen geben 40 bis 50% Stickstoff als Harnstoff, ca. 30% im Filtrate von der Phosphorwolframsäurefällung.

Der Rest des Stickstoffes wurde im Phosphorwolframsäureniederschlag gefunden und dürfte sich nach qualitativen Versuchen im Wesentlichen auf den Gehalt an Hexonbasen zurückführen lassen.

III. Allen Eiweisskörpern kommt die Eigenschaft zu, einen sehr beträchtlichen Theil des Stickstoffes nach dem angegebenen Verfahren als Harnstoff abspalten zu können. Ebenso allgemein, wenngleich in viel geringerer Menge, ist bei der Oxydation die Bildung von Hexonbasen zu verzeichnen. Abweichend von den Hofmeister'schen Versuchen ist die Eigenschaft der Harnstoffbildung bei den angegebenen Oxydationsversuchen von der Gegenwart anderer stickstoffhaltiger Substanzen (Ammoniak) unabhängig.

IV. Für die Eiweisspaltung im Organismus muss gleichzeitig Hydrolyse und Oxydation angenommen werden.

V. Aus den früher publicirten Arbeiten des Verfassers geht hervor, dass nur die  $\text{CONH}_2$ - resp.  $\text{CONH}$ -Gruppe zur Harnstoffbildung befähigt ist und auch dieses nur, wenn sie sich an einem leicht oxydablen Rest befindet, dessen Structur auch von Einfluss ist. Es ist somit auch für die Eiweisskörper sehr wahrscheinlich, dass die Harnstoffbildung auf  $\text{CONH}$ -Gruppen zurückzuführen ist, von denen nach den Analysen-Resultaten eine sehr erhebliche Menge im Eiweissmolekül vorhanden sein muss. Der Rest des Stickstoffes sind vornehmlich Hexonbasen.

VI. Ueber die Beziehungen der gebildeten Harnstoffmengen zum chemischen und physiologischen Charakter der Eiweisskörper wird seiner Zeit auf Grund von Nährversuchen berichtet werden.

# Ueber das Verhalten der Pentosen, insbesondere der l-Arabinose im Thierkörper.

Von  
E. Salkowski.

---

(Aus dem chem. Laboratorium des patholog. Instituts zu Berlin.)  
(Der Redaction zugegangen am 8. April 1901.)

---

Nachdem Tollens, der Entdecker der Pentosen, und seine Schüler die grosse Verbreitung der Pentosen im Pflanzenreich festgestellt haben, ist durch eine Reihe von Beobachtungen aus neuerer Zeit auch das Interesse bezüglich des Vorkommens und Verhaltens der Pentosen im Thierkörper in erhöhtem Grade erweckt worden. Es sei an die Auffindung einer Pentose, die dann später von C. Neuberg als inactive Arabinose erkannt wurde, unter abnormen Verhältnissen im Harn erinnert, an die Entdeckung einer solchen unter den Spaltungsprodukten der Hefenucleinsäure von Kossel, unter den Spaltungsprodukten des Pankreasnucleoproteids von Hammarsten und mir, der Nucleoproteide anderer Organe von F. Blumenthal, Beobachtungen, an welche sich dann die Feststellung einer Pentose als Spaltungsprodukt der Guanylsäure durch Bang anschliesst. Ich habe sehr bald, nachdem ich die Harnpentose aufgefunden hatte, Versuche über das Verhalten der leicht zugänglichen l-Arabinose im Thierkörper angestellt, bin jedoch durch andere Arbeiten von diesem Gegenstand abgezogen worden. Es sind inzwischen zahlreiche Versuche über das Schicksal verfütterter Pentosen am Menschen ausgeführt worden, in besonders grossem Umfange von Jaksch,<sup>1)</sup>

---

<sup>1)</sup> Maly's Jahresb. f. 1899, S. 831. Zeitschr. f. Heilkunde, Bd. 20 S. 196. Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 63, S. 612.

unten noch zurückkomme, mancherlei Fragen offen, die nur gemäss nur durch das Experiment am Thier entschieden werden können. Thierversuche liegen nur verhältnissmässig wenige vor; aus diesem Grunde scheinen mir meine Versuche doch noch der Mittheilung werth.

Das, was mich in erster Linie zu den Versuchen mit Pentosen bewog, war Folgendes: So wenig geklärt sind die Vorstellungen über die Bildung des Glycogens sonst auch, so herrscht, namentlich nach den Untersuchungen von C. v. S. und seinen Schülern, darüber wohl Uebereinstimmung, dass gewisse Zuckerarten direkt Glycogen zu bilden vermögen, dass man sich eine Entstehung von Glycogen aus Glucose oder einfache Wasserabspaltung wohl denken kann. Es lag mir wohl auch im Bereich des Denkbaren, durch Verfütterung von Pentosen unter geeigneten Bedingungen zu einem Glycogen mit 5 Atomen Kohlenstoff zu gelangen. Diese Bemühungen waren, wie ich gleich bemerken will, völlig erfolglos: unter dem Einfluss der Arabinose gebildete Glycogen war gewöhnliche und lieferte bei der Hydrolyse Dextrose. Ausserdem aber berücksichtigte ich bei Anstellung meiner Versuche einige andere Punkte, nämlich 1. inwieweit die l-Arabinose im Organismus zersetzt bzw. durch den Harn ausgeschieden wird; 2. ob der Arabinose ein Nährwerth nach Art der Kohlehydrate mit 6 Atomen C zuzuerkennen ist.

Die zu den Versuchen erforderliche Arabinose habe ich grösstentheils selbst dargestellt, nur die zu dem Versuch VI benutzte war nach Schuchardt in Görlitz bezogen. Die Darstellung geschah nach Kilius, jedoch nur zum Theil aus Kirschgummi, zum Theil aus geeignetem Gummi arabicum. Die Ausbeute war nicht gross und die Reinigung ziemlich schwierig. Zur Identificirung der Arabinose dienten neben den allgemeinen Reactionen der Pentosen, die Feststellung der specifischen Drehung, der Schmelzpunkt des Osazons und die Unvergährbarkeit. Die Lösung in Hefeabkochung durch Hefe.

Die Versuche sind an Kaninchen angestellt, deren Leber durch 5—6tägiges Hungern annähernd glycogenfrei gemacht

---

1) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 19, S. 3030.

war, ein Versuch an einem Huhn. Was die Glycogenbestimmung betrifft, so wurde die Leber nach kurzem Erhitzen in siedendem Wasser fein zerhackt und zerrieben, mehrmals mit Wasser ausgekocht, colirt und abgepresst. Der dabei bleibende Rest wurde nach Külz mit Kali zerkocht und nach dem Ansäuern mit Salzsäure mit Brücke'scher Lösung gefällt. Dabei kam es oft vor, dass die Filtrate trüb waren und sich auf Zusatz von Alkohol klärten, dann erst bei Zusatz von mehr Alkohol Glycogen fallen liessen, wie dieses auch Pflüger beobachtet hat. Die von Pflüger aufgefundene Fehlerquelle, dass der durch die Brücke'sche Lösung gebildete Niederschlag Glycogen einschliesst, ist natürlich nicht berücksichtigt, da die Versuche vor der betreffenden Arbeit von Pflüger angestellt sind. Es ist dadurch also der Glycogengehalt etwas zu niedrig gefunden, doch kann der Fehler nicht gross sein, da die Hauptmenge des Glycogens schon durch das Auskochen mit Wasser entfernt war. Unter allen Umständen sind die erhaltenen Werthe für Glycogen — Fehler zugegeben — um so beweisender. Die bei der Behandlung mit Wasser einerseits und mit Kali andererseits schliesslich erhaltenen Lösungen wurden nicht vereinigt, sondern getrennt verarbeitet. Es ergaben sich so für jede Leber 2 getrennte Glycogenbestimmungen: eine für den wässerigen Auszug und eine für die durch Kali erhaltene Leberlösung. Dieses Verfahren erscheint unnöthig umständlich, ich habe daher zu rechtfertigen, warum ich es befolgt habe. Es geschah zunächst darum, weil die Versuche in erster Linie in der Absicht angestellt waren, womöglich zu einem Glycogen mit 5 Atomen Kohlenstoff zu gelangen, und ich nicht wissen konnte, ob dieses nicht vielleicht durch Erhitzen mit Kali zerstört werden würde. Dann aber, als es sich schon in den ersten Versuchen gezeigt hatte, dass das erhaltene Glycogen das gewöhnliche sei, behielt ich das Verfahren bei, weil das Glycogen durch die Extraction mit Wasser stets in typischer Form erhalten wurde, während das nachträglich durch Kali erhaltene oft eine dextrinartige Beschaffenheit hatte.

Bei den Versuchen an Kaninchen musste ich auch den Harn sammeln behufs Ermittlung des Arabinose- und des

N-Gehaltes. Die Sammlung geschah in einem geeigneten Käfig, die Abgrenzung der Hungerperiode von der vorangehenden Fütterungsperiode und der nachfolgenden Arabinoseperiode, geschah durch Abpressen. Meistens gelang dieses leicht, manchmal aber machte es doch Schwierigkeiten und ich bin auch nicht sicher, ob ich immer den Harn bis auf den letzten Tropfen herausbekommen habe. Es zeigte sich nämlich mitunter bei der Section der Thiere noch etwas Harn in der Blase, trotzdem die Blase vorher abgedrückt war. Derselbe wurde natürlich berücksichtigt. Es könnten wohl Fehler, wenn auch nur unerhebliche, für den Harn des Versuchstages nach Einführung der Pentose vorgekommen sein in dem Sinne, dass sich diesem fälschlich noch etwas Hungerharn hinzudröhte, der Werth für N also zu hoch gefunden wurde.

Nach diesen Vorbemerkungen lassé ich nunmehr die Versuchsprotokolle in möglichst kurzer Form folgen.

#### Versuch an einem Huhn.

Anfangsgewicht 1700 g, nach 4tägigem Hungern 1498 g, Gewichtsverlust 11,7%.

10<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Uhr Vormittags und 3 Uhr Nachmittags je 5 g Arabinose, in 20 g Wasser gelöst, durch einen Trichter mit angesetztem Schlauch eingegossen. Getödtet am folgenden Tage 9<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Uhr, also 23 Stunden nach der ersten, 18<sup>1</sup>/<sub>2</sub> Stunden nach der zweiten Eingiessung. Im Käfig dünne Entleerungen, die zum Theil in die untergesetzte Schale geflossen sind. Bei der Section ziemlich viel Fett; Kropf, Magen, Darm völlig leer, nur etwas Schleim enthaltend, daher nicht untersucht. Untersucht Leber, Muskeln, Blut, die Entleerungen.

1. Leber: 28 g. Die wässerige Abkochung sieht stark milchig aus, sie liefert 0,632 g (natürlich durch Umfällen gereinigtes) Glycogen. Aus dem Rückstand durch Kali erhalten 0,052 g, also im Ganzen 0,684 g.

2. Muskeln. 280 g fein gehackt, 1 Stunde mit Wasser ausgekocht. Der Auszug ist klar, nicht milchig, direkt, sowie nach dem Eindampfen auf 100 ccm. keine Jodreaction, starke Phlg-Reaction (Abkürzung für Phloroglucin). Bei Anstellung der Trommer'schen Probe starke Reduction.

3. Blut mit Wasser verdünnt, auscoagulirt, Filtrat absolut klar, farblos, nach dem Einengen keine Jodreaction, deutliche Phlg-Reaction.

4. Die Entleerungen mit Alkohol versetzt, ebenso der Käfig mit verdünnten Alkohol abgespült, alles vereinigt, filtrirt, eingedampft. Der Auszug gibt starke Phlg-Reaction, doch ist dieses nicht unbedingt beweisend für Pentosegehalt der Darmentleerung oder des Harns, da sich

nicht ausschliessen lässt, dass von der eingegossenen Lösung etwas direkt wieder entleert ist.

Der Auszug der Darmentleerungen von 3 Hungertagen gab übrigens keine Phlg-Reaction.

#### Kaninchen I.

Isolirt den 15. 7., zum Versuch 20. 7., Dauer des Hungerns 5 Tage. Anfangsgewicht 2200 g, Endgewicht am 20. 7. 1750 g, Gewichtsverlust 450 g (90 g pro Tag) = 22 %.

Am 20. 7., 12 Uhr, 8,75 g Arabinose, in 35 ccm. Wasser gelöst, mit elastischem Katheter in den Magen. Getödtet am 21. 7., 10 Uhr, also nach 23 Stunden. Im Magen, Cöcum, Dickdarm noch reichlich Nahrungsreste, im Dünndarm wenig, Inhalt nicht näher untersucht.

1. Leber 62 g. Die wässerige Abkochung — milchweiss — liefert 1,526 g Glycogen, der Rückstand mit Kali gekocht 0,1535 g, zusammen 1,6795 g. Eine sehr kleine abgenommene Probe des wässerigen Auszuges gibt starke Phlg-Reaction.

2. Blut 35 g, auscoagulirt, der Auszug gibt sehr deutliche, aber nicht starke Phlg-Reaction.

3. Muskeln 480 g. Der Auszug ist klar, nach dem Einengen keine Jodreaction, starke Phlg-Reaction, starke Reduction bei Anstellung der Trommer'schen Probe.

4. Harn der Arabinoseperiode (mit etwas Wasser) 140 ccm., Arabinosegehalt nach der Drehung (der Einfachheit halber halb so gross angenommen wie die des Traubenzuckers) 0,2 % = 0,28 g, gährt nicht.

#### Kaninchen II.

Isolirt den 10. 9., zum Versuch 16. 9. Dauer des Hungerns 6 Tage. Anfangsgewicht 1710 g, Endgewicht 1210 g, Gewichtsverlust 500 g (83 g pro Tag) = 29 %.

Am 16., 10 Uhr Vormittags und 3 Uhr Nachmittags, je 5 g Arabinose. Getödtet 17., 10 Uhr, 24 Stunden nach der ersten, 19 Stunden nach der letzten Arabinosegabe.

1. Leber 31 g, schlaff, klein, mit Protospermien durchsetzt. Auszug nicht milchig, ganz hell. Glycogen 0. Der Auszug gibt deutliche Phlg-Reaction.

2. Muskeln 255 g. Auszug ganz klar, Glycogen 0, intensive Phlg-Reaction.

3. Harn 80 ccm., 1,65 % Arabinose = 1,32 g, also 13,2 % unverändert ausgeschieden.



### Kaninchen III.

Isolirt am 17. 9., Nachmittags 4 Uhr, zum Versuch 24. 9., Nachmittags 10 $\frac{1}{2}$  Uhr, Dauer des Hungerns 6 $\frac{3}{4}$  Tage. Anfangsgewicht 3425 g, Endgewicht 2700 g, Gewichtsverlust 725 g (107 g pro Tag) = 21,1%. Am 24., 10 $\frac{1}{2}$  Uhr, 5 g Arabinose, ebenso Abends 7 Uhr.

Getödtet 25., Morgens 9 $\frac{1}{2}$  Uhr, 23 Stunden nach der ersten, 14 $\frac{1}{2}$  Stunden nach der zweiten Arabinosegabe.

1. Leber 63 g. Verarbeitung etwas abweichend; erst sofort gehackt, dann ausgekocht, Auszug schwach milchig, Glycogen 0,403 g. Rückstand mit Kali gekocht liefert 0,192 g, zusammen 0,595 g.

2. Muskeln. Im wässrigen Auszug keine Jodreaction, stark Phlg-R.

3. Hungerharn, 510 ccm., N-Gehalt 1,848% = 9,425 g.

4. Versuchsharn mit Wasser auf 100 ccm., directe Polarisation wegen zu dunkler Färbung nicht ausführbar; nach der Entfärbung mit Kohle 1,0% Arabinose = 10% unveränderte Ausscheidung. N-Gehalt 1,148% = 1,148 g.

### Kaninchen IV.

Isolirt 2. 2., zum Versuch 7. 2. Dauer des Hungerns 5 Tage. Anfangsgewicht 2100, Endgewicht 1730, Verlust 370 g (74 p. d.) = 17,6%.

Am 7. 11 Uhr Vormittags 5 g Arabinose, ebensoviel 3 Uhr Nachmittags.

Getödtet 8. 2., 24 Stunden nach der ersten, 20 Stunden nach der letzten Arabinosegabe.

1. Leber 45 g, zuerst mit Wasser ausgekocht ohne Essigsäurezusatz, Filtration geht langsam, beim Eindampfen bilden sich Häute, die Glycogen ausschliessen, diese werden durch Zusatz von Natronlauge zerstört. Die wässrige alkalische Lösung, mit Salzsäure nach Brücke angesäuert etc., gibt 1,3756 g Glycogen, der Rückstand mit Kali gekocht 0,6822 g, zusammen 2,0578 g.

2. Blut 50 ccm., auscoagulirt etc., auf 20 ccm. reducirt, äusserst intensive Phlg-R.

3. Muskeln 500 g, ausgekocht auf 125 ccm. reducirt. Sehr intensive Phlg-R.

4. Magen und Darminhalt ausgekocht etc., auf 20 ccm. reducirt, dann durch  $\text{CaCl}_2$  und  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  geklärt: schwache Phlg-R.

5. Harn der Hungerperiode (etwas Verlust) 400 ccm., N-Gehalt 0,792% = 3,168 g.

6. Harn der Arabinoseperiode auf 100 ccm. aufgefüllt. Arabinosegehalt 1,4% = 1,4 g. N, 0,455% = 0,455 g.

### Kaninchen V.

Isolirt 5. 2., zum Versuch genommen 10. 2. Dauer des Hungerns also 5 Tage. Anfangsgewicht 2210, Endgewicht 1775, Gewichtsverlust 420 g (pro Tag 84 g) = 19,0%.

Am 10. 2. Vormittags 11 Uhr 5 g Arabinose, ebenso am Nachmittag 3 Uhr.

Getödtet 11. 2., 23 Stunden nach der ersten, 19 Stunden nach der zweiten Arabinosegabe.

1. Leber 45 g; unter Anwendung von Essigsäure ausgekocht, die Filtration geht sehr glatt. Glycogen im wässerigen Auszug 1,034 g; aus dem Rückstand durch Kali erhalten 0,0988 g, zusammen 1,1328 g.

2. Blut ca. 50 ccm., auscoagulirt etc., reducirt auf 20 ccm.; starke Phlg.-R. Positive Trommer'sche Probe.

3. Magen und Darminhalt vollständig verarbeitet, auf ein geringes Volumen reducirt: deutliche, aber nicht starke Phlg.-R.

4. 400 g Muskeln mit Wasser ausgekocht u. s. w., der Auszug auf 100 ccm. reducirt, starke Phlg.-R.

5. Harn der Hungerperiode auf 400 ccm. N 0,98% = 0,98 g. Arabinosegehalt 2,4% = 2,4 g.

#### Kaninchen VI.

Isolirt 18. 2., zum Versuche genommen 23. 2., Dauer des Hungerns also 5 Tage. Anfangsgewicht 2629, Endgewicht 2155, Gewichtsverlust 474 g (95 g pro Tag) = 18%.

Am 23. 10 Uhr 7,5 g Arabinose (von Schuchardt in Görlitz), ebenso am Nachmittags 3 Uhr. Getödtet 24. 2. 10 Uhr, 24 Stunden nach der ersten, 19 Stunden nach der zweiten Arabinosegabe.

1. Leber 42 g, der wässerige Auszug (unter Essigsäurezusatz verarbeitet) liefert 0,9534 g Glycogen, der Rückstand mit Kali gekocht 0,2280, zusammen 1,1814 g.

2. Blut auscoagulirt etc., auf 20 ccm. reducirt, starke Phlg.-R., starke Trommer'sche Probe.

3. Muskeln, 200 g, direkt mit Kali gekocht, liefern 0,1144 g Rohglycogen von bräunlichem Aussehen, wovon jedoch nach nochmaliger Ausfällung mit Brücke'schem Reagens nur 0,0130 g Reinglycogen. Das Rohglycogen ist ausnahmsweise in diesem Falle gewogen, weil es mir von Interesse war, die Differenz kennen zu lernen.

4. Harn der Hungerperiode 410 ccm. mit 1,67% N = 6,947 g.

5. Harn des Arabinosetages 104 ccm., Arabinosegehalt 2,9% = 3,016 g = 20,1% der eingeführten Arabinosen. N-Gehalt 0,738% = 0,7675 g.

#### Kaninchen VII.

Isolirt am 25. 3., zum Versuch genommen 30. 3., also Dauer des Hungerns 5 Tage. Anfangsgewicht 2207, Endgewicht 1760, Gewichtsverlust 447 g (89,5 pro Tag) = 20,5%.

Entleert 51,5 g Urn, 21 Stunden nach der ersten, 15 Stunden nach der zweiten Arabinosegabe.

1. Leber 41 g. Die wässrige Abkochung liefert 0,4374 g, der Rückstand mit Kali gekocht noch 0,2714 g, zusammen 0,7088 g.

2. Blut 39 ccm., auscoagulirt etc. auf 20 ccm. reducirt; starke Phlg-R., starke Trommer'sche Probe.

3. Muskeln, 100 g liefern mit Kali gekocht nur eine minimale Ausscheidung an Glycogen.

4. Hungerharn auf 400 ccm. N-Gehalt 0,756% = 3,024 g.

5. Harn des Arabinosetages 100 ccm. Arabinosegehalt 2,1% = 2,1 g = 21% der eingegebenen. N-Gehalt 1,008% = 1,008 g.

Wenden wir uns nunmehr zu den aus den Versuchen zu ziehenden Schlussfolgerungen.

## 1. Die Resorption und Ausscheidung der Arabinose.

Die Arabinose ist zweifellos innerhalb der Versuchszeit von 23—24 Stunden zum grössten Theil resorbirt. Die Darm-entleerungen sind allerdings nicht auf Arabinose untersucht und zwar aus verschiedenen Gründen: 1. weil man nicht darauf rechnen kann, dass der Darminhalt bzw. Mageninhalt beim Kaninchen schon in 24 Stunden den Mastdarm erreicht; 2. weil es nicht möglich ist, die Fäces vollständig vor der Berührung mit Harn zu bewahren. Die annähernd vollständige Resorption geht aber daraus hervor, dass im Dickdarminhalt immer, so oft darauf untersucht wurde, nur noch Spuren von Arabinose und auch im Magen nur sehr geringe Mengen nachweisbar waren. Dagegen kann man nicht geltend machen, dass nach meinen eigenen Versuchsprotokollen die Phloroglucinreaction mit Mageninhalt noch ziemlich intensiv war, bei der Beurtheilung dieses Befundes kommt die ausserordentliche Empfindlichkeit dieser Reaction in Betracht. In keinem Falle wurden diarrhoische Entleerungen beobachtet, während dieses beim Menschen nach v. Jaksch die Regel ist und zwar bei Arabinosegaben, die relativ viel geringer waren, etwa  $\frac{1}{3}$  g pro Kilo, während die Kaninchen 4—5 g pro Kilo Körpergewicht erhielten.

Unverändert ausgeschieden wurden in meinen Versuchen von den Dosen von 10 g in 5 Versuchen 1,32; 1,0; 1,4; 2,4

und 2,1 g, also im Ganzen von 50 g  $9,22 \text{ g} = 18,44\%$  oder rund  $\frac{1}{5}$ , wobei die grossen Schwankungen in den einzelnen Versuchen sehr auffallend sind. Auch bei Steigerung der Dosis auf das  $1\frac{1}{2}$ fache  $= 15 \text{ g}$  pro Tag liegt die ausgeschiedene Quantität mit 3,016 g, etwas über  $20\%$ , noch innerhalb der Grenzen des bei 10 g in einzelnen Versuchen ausgeschiedenen Anthells und übersteigt die Mittelzahl nur wenig. Bemerkenswerth ist, dass ein Thier von 8,75 g eingeführter Arabinose nur 0,28 g, also  $3,20\%$ , unverändert ausschied; da es sich hierbei um einen vereinzelt Versuch handelt, ist auf diese Abweichung kein grosser Werth zu legen. Cremer<sup>1)</sup> gab einem Kaninchen von 2836 g Endgewicht am 4. Hungertage 28,75 g Arabinose auf einmal. In den nächsten 15 Stunden wurden hiervon 4,34 g durch den Harn ausgeschieden; da sich aber noch 8,74 g Arabinose im Darm fanden, so sind diese von der eingeführten Quantität abzuziehen, es sind somit nur 20 g als resorbiert anzusehen. Davon wurden 4,34 g  $= 21,7\%$  wieder ausgeschieden. Dies stimmt mit meinen Beobachtungen im Ganzen überein. Die erhebliche Wiederausscheidung von  $18,44\%$  nach Dosen von 10 g zeigt, dass die Assimilation der Arabinose von der des Traubenzuckers sehr wesentlich abweicht. Cremer<sup>2)</sup> berichtet, dass ein Kaninchen nach 30 g Traubenzucker am 4. Hungertage keinen Zucker im Harn ausschied und nach 10 g Traubenzucker innerlich ist beim Kaninchen wohl nie Zucker im Harn zu finden. Ob die geringe Ausscheidung von  $3,2\%$  nach Einführung von 8,75 g auf das Bestehen einer Assimilationsgrenze im Sinne von Hofmeister hindeutet, bleibt zweifelhaft. Trotz dieser relativ hohen Ausscheidung verhält sich die Arabinose beim Pflanzenfresser doch anders wie beim Menschen.

Cremer (l. c. S. 546) fand nach Aufnahme von 25,1 g Arabinose 9,13 g unverändert im Harn  $= \text{ca. } 36,4\%$ . Jaksch fand, dass Fiebernde nach 20 g Arabinose allerdings nur  $5,65-5,95\%$  unverändert ausschieden, Nichtfiebernde aber

---

1) Zeitschr. f. Biol., Bd. 29, S. 544.

2) l. c. S. 521.

Dosis in Betracht, welche beim Menschen, wie oben erwähnt, sich auf ca.  $\frac{1}{3}$  g pro Kilo stellt, bei Kaninchen aber auf etwa 4—5 g, also 12 bis 15 Mal so hoch.

Die Arabinose zeigt bezüglich ihres Verhaltens im Organismus beim Menschen entschieden den Typus der schwer oxydirbaren, heterogenen, körperfremden Substanzen, während dieses beim Kaninchen nicht so sicher ist.

Es erscheint mir nothwendig, dieses etwas näher zu begründen.

Ueberblickt man das Verhalten organischer **chemischer Verbindungen** im Organismus, soweit **sie für diesen überhaupt angreifbar sind und ihn nicht in toto unverändert passiren**, so **ergibt sich** unschwer eine Eintheilung in 3 Gruppen.

1. Die erste Gruppe umfasst diejenigen Verbindungen, für welche die Assimilationsfähigkeit<sup>1)</sup> **des Organismus**, wie es scheint, **keine obere Grenze hat**. Hierher gehören, soviel wir wissen, nur Fett und Eiweiss. Es kommt niemals, auch bei noch so reichlicher Zufuhr vor, dass etwas von diesen Verbindungen unverändert durch den Harn ausgeschieden wird.<sup>2)</sup>

2. Die zweite Gruppe umfasst diejenigen Verbindungen, welche in grosser Menge assimiliert werden, bei welchen indessen diese Quantität eine durch Versuche leicht feststellbare Grenze, die «Assimilationsgrenze» von Hofmeister, hat. In diese Klasse gehören die Zuckerarten mit 6 bzw. 12 Atomen Kohlenstoff. Bekanntlich liegt diese Grenze bei den verschiedenen Zuckerarten verschieden, am höchsten beim Menschen wohl für den Traubenzucker, erheblich niedriger für den Milchezucker. Ueberschreitet man die Assimilationsgrenze, so wird allerdings nicht der Ueberschuss über diese durch den Harn

---

1) Die Assimilation wird mitunter mit der Resorption zusammen geworfen; selbstverständlich ist sie von dieser streng zu trennen: der Ausdruck «Assimilation» bezieht sich nur auf die Vorgänge — Ansatz, Spaltung, Oxydation —, welche jenseits des Darmkanals vor sich gehen.

2) Nach v. Noorden kann es allerdings vorkommen, dass bei einseitiger massenhafter Zufuhr eines bestimmten Eiweisskörpers — Eieralbumin — dieser Eiweisskörper im Harn erscheint. Berl. klin. Wochenschr. 1886, Nr. 11.

ausgeschieden, wohl aber ein Theil, und um so mehr, je höher der Betrag ist, um welchen die Assimilationsgrenze überschritten wird. Nach den Untersuchungen von P. Mayer<sup>1)</sup> scheint dann stets auch Glycuronsäure, unter Umständen auch Oxalsäure als Produkt der unvollständigen Oxydation ausgeschieden zu werden. Die Nährstoffe der gewohnheitsmässig aufgenommenen Nahrung gehören ausschliesslich, wenn nicht in die erste, so in diese zweite Gruppe von Substanzen. Vermuthlich gehört auch der Alkohol in diese Gruppe, der unter Umständen sicher auch ernährende Wirkung ausübt, indem er die Einfuhr einer gewissen Anzahl von Calorien entbehrlich macht, d. h. es ermöglicht, mit einem geringeren Brennwerth der Nahrung auszukommen, als ohne ihn. Aber nicht allein die Nährstoffe gehören in eine dieser beiden Gruppen, sondern vor Allem eine Reihe organischer Säuren, die man früher unter der Bezeichnung «Pflanzensäuren» zusammenfasste, wie die Weinsäure, Aepfelsäure, Bernsteinsäure, Citronensäure und die meistens noch hierzu hinzugerechnete Milchsäure, welche im Organismus mit der grössten Leichtigkeit oxydirt werden. Einige dieser Säuren haben eine obere Assimilationsgrenze; für die verschiedenen Weinsäuren ist dieses von A. Brion<sup>2)</sup> nachgewiesen, für die Citronensäure nach dem angeblich constanten Gehalt der Milch an dieser Säure wahrscheinlich.

3. Die dritte Gruppe wird aus denjenigen, meistens der aromatischen Reihe angehörenden, organischen Verbindungen gebildet, dereren Assimilationsgrenze oder, wie man in diesem Falle richtiger sagen würde, Oxydationsgrenze eine ausserordentlich niedrige ist; die Grenze liegt für diese so niedrig, dass man fast sagen kann, sie wird durch diejenige Quantität erreicht, die wir mit unseren Hilfsmitteln in den Excreten noch nachweisen können; auch von einem verabreichten Minimum wird immer noch ein Theil ausgeschieden; als Beispiel nenne ich das Phenol — es ist natürlich dabei irrelevant, ob die Verbindung als solche oder als Glycuronsäure, Aetherschwefelsäure u. s. w. ausgeschieden wird: auch die Aus-

1) Deutsche med. Wochenschr. 1901, Nr. 16 u. 17.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXV, S. 283.

anzusehen. Geht man über dieses Minimum hinaus, so wird, gerade so, wie bei den Verbindungen der zweiten Gruppe, nicht etwa alles über dieses Minimum Hinausliegende unverändert ausgeschieden, sondern nur ein Theil, ein Theil dagegen oxydirt. Absolut genommen, wächst der oxydirte Antheil mit der Quantität der eingeführten Substanz; relativ, d. h. im Verhältniss zur eingeführten Menge sinkt er. Ich darf vielleicht zur Erläuterung des Gesagten ein Beispiel anführen. Dasselbe ist einer Versuchsreihe entnommen, welche vor langen Jahren zur Aufklärung dieser Verhältnisse auf meine Anregung und unter meiner Leitung von E. Tauber<sup>1)</sup> an einem Hunde im Stickstoffgleichgewicht angestellt ist, dessen Harn bei der Destillation mit Salzsäure keine nachweisbare Quantität Phenol lieferte. Derselbe erhielt in Perioden von einigen Tagen steigende resp. fallende Mengen von Phenol. Im Mittel gestalteten sich die Verhältnisse dabei folgendermaassen:

Eingeführtes Phenol pro Tag	Im Harn wieder- erhalten	Oxydirt	
		absolute Quantität	In Procenten des eingeführten
0,06	Spuren	fast alles	—
0,12	0,036	0,082	68,7
0,24	0,111	0,129	53,8
0,36	0,161	0,199	55,2
0,48	0,258	0,222	45,1

Trotzdem also der Organismus des Hundes im Stande war, 0,222 g in 24 Stunden zu oxydiren, wurde doch von 0,12 g eingegebenem Phenol fast  $\frac{1}{3}$  unverändert ausgeschieden, und von 0,06 g immer noch eine nachweisbare Quantität. Dieser Gruppe gehört, soweit bekannt, keine Verbindung an, die wir gewohnheitsmässig als Nährstoff mit der Nahrung

1) Diese Zeitschrift, Bd. II, S. 366 (1878/79).

einführen. Ein solcher «Nährstoff» würde auch ausserordentlich unzweckmässig sein, da von ihm stets ein grosser Theil verloren ginge, jedes Individuum ihm gegenüber also in derselben Lage wäre, wie der Diabetiker gegenüber dem Traubenzucker. Ich beanspruche natürlich nicht, in den vorstehenden Bemerkungen über den Gegenstand, d. h. die Beziehungen eingeführter organischer Verbindungen zu den zersetzenden Kräften des Organismus etwas wesentlich Neues gesagt zu haben, dieselben entspringen vielmehr lediglich Betrachtungen, welche sich mir bei dem Versuch, mir die Stellung der Pentosen im Organismus klar zu machen, aufdrängten.

Nach dieser Eintheilung gehören die Pentosen für den Menschen unzweifelhaft in die dritte Gruppe, d. h. der heterogenen, körperfremden Substanzen; dafür spricht der grosse Betrag des unverändert im Harn ausgeschiedenen Antheils nach Cremer und Jaksch und die Erfahrungen, die Ebstein und Andere mit der Einführung kleiner Mengen von Pentosen gemacht haben. Ebstein<sup>1)</sup> sah schon nach Einnahme von 0,25 g Arabinose im Harn die vorher nicht vorhanden gewesene Phloroglucinreaction auftreten, ebenso nach 0,05 g Xylose, Cremer nach 1 g.

Es ist daraus nicht unbedingt zu schliessen, dass dasselbe auch für den Pflanzenfresser gilt, für diesen betrachte ich die Frage, ob auch sehr kleine Mengen verabreichter Arabinose in den Harn übergehen, noch als eine offene. Der Entscheidung stellen sich verschiedene Schwierigkeiten entgegen, einerseits der Umstand, dass der Kaninchenharn nicht selten die Farbenreactionen der Pentosen (und Glycuronsäure) gibt, auch bei der Destillation mit Salzsäure merklich Furfurol liefert, andererseits die Möglichkeit, dass kleine Mengen verabreichter Pentosen im Darmkanal zerstört werden könnten, eine Möglichkeit, die um so näher liegt, seitdem ich<sup>2)</sup> die leichte Zerstörbarkeit der Arabinose und Xylose durch Fäulnisbakterien aufgefunden habe.

---

<sup>1)</sup> Virchows Arch., Bd. 129 (1892), S. 410.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 478.



Ein an einem Huhn nach 4tägigem Hungern angestellter Versuch ergab 0,684 g Glycogen in der Leber. Sieben Versuche sind an Kaninchen angestellt, sechs mit positivem Erfolg, jedoch mit sehr wechselnden Glycogenmengen, einer nach 6tägigem Hungern mit negativem. Das negative Resultat erklärt sich vielleicht durch die Beschaffenheit der Leber, welche schlaff, klein und mit Psorospermien durchsetzt war. Die erhaltenen Werthe für das Glycogen sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Nummer des Thieres	Glycogen in der Leber		
	a) im wässerigen Auszug	b) im Rückstand	c) zusammen
1	1,526	0,1535	1,6795
3	0,408	0,192	0,595
4	1,3756	0,6822	2,0578
5	1,034	0,0988	1,1328
6	0,1144	0,0130	0,1274
7	0,4374	0,2714	0,7088

Die Muskeln sind bei Kaninchen 6 und 7 auf Glycogen untersucht, in beiden Fällen ergaben sich nur sehr geringe Werthe: Bei Nr. 6 in 200 g Muskeln 0,0130 g, bei Nr. 7 in 100 g nur eine minimale Ausscheidung.

Zur Entscheidung der Frage, ob diese Glycogenmengen etwa von Eiweisszerfall abzuleiten sind, wenden wir uns an die Betrachtung der N-Ausscheidung, die in 5 Fällen bestimmt ist.

Nummer des Versuchs- thieres	N-Ausscheidung im Hunger		N- Ausscheidung am Arabinosetage	Verhältniss von N: Glycogen = 1:
	im Ganzen	pro Tag		
3	9,425	1,396	1,148	0,52
4	4,20	0,80	0,455	4,52
5	4,872	0,974	0,98	1,15
6	6,947	1,395	0,768	0,17
7	3,024	0,605	1,008	0,70

und der Quantität des gefundenen Glycogens zeigt, dass nach den jetzt herrschenden Anschauungen über die Abstammung des Glycogens nur bei Kaninchen 4 eine etwaige direkte Abstammung aus der eingeführten Arabinose in Betracht zu ziehen ist, während in allen anderen Fällen hierzu keine Nöthigung vorliegt, vielmehr das Auftreten des Glycogens in der Leber sehr wohl nach der «Ersparnisstheorie» erklärt werden kann, nur bei Kaninchen 4 würde dieses nicht mehr möglich sein. Bei diesem Thier fällt aber die im Harn des Arabinosetages gefundene N-Menge ganz aus der Reihe, und wenn ich auch nichts von Fehlern bei der Sammlung des Harns oder bei der Bestimmung des N weiss, so erscheint es doch sehr gewagt, auf diesen einen Befund hin eine direkte Bildung von Glycogen aus Arabinose anzunehmen, um so mehr, als man sich über diesen Vorgang kaum eine Vorstellung machen könnte. Es bleibt daher wahrscheinlich, dass hier irgend welche Fehler vorliegen, und dass auch in diesem Fall das Glycogen nach der Ersparnisstheorie zu erklären ist.

Was die Natur des erhaltenen Glycogens betrifft, so ist es, wie bereits oben erwähnt, das gewöhnliche mit 6 Atomen C, ja es erwies sich sogar als ganz frei von Pentosen, bezw. Pentosanen. Zur Untersuchung wurde alles von Kaninchen erhaltene Glycogen, abgesehen von kleinen, zu gelegentlichen Versuchen verbrauchten Quantitäten, vereinigt, in Wasser gelöst und mit Alkohol gefällt. Es wurde so als schneeweisses, äusserst feines Pulver erhalten, welches allerdings noch 0,96% Asche enthielt. Die von Dr. G. Schrader, damaligem Assistenten, ausgeführte Elementaranalyse ergab für die bei 110° getrocknete Substanz, aschefrei berechnet, C 44,20%, H 6,10%, bei einer zweiten Bestimmung C 43,88%, H 6,05%,<sup>1)</sup> also im Mittel C 44,04%, H 6,08%. Die Formel  $C_6H_{10}O_5$  erfordert C 44,44%, H 6,17%, die Huppert'sche Formel  $6(C_6H_{10}O_5) + H_2O$  erfordert C 43,64, H 6,26.

Die gefundenen Werthe für den Kohlenstoff liegen etwa in der Mitte zwischen den beiden Formeln, der Wasserstoff

---

1) Die Analysenzahlen sind leider abhanden gekommen.

handelt. Weiterhin wurde ein Theil des Glycogens hydrolysiert und zu Reactionen auf Arabinose und zur Darstellung des Osazons benützt. Die Reactionen auf Arabinose fielen gänzlich negativ aus, auch nach Vergährung des Zuckers, das Osazon erwies sich als Glucosazon.

Gelegentlich wurde noch der aus dem Glycogen durch Hydrolyse erhaltene Zucker titirt.

0,467 g bei 110° bis zur Gewichtsconstanz getrocknetes Glycogen wurde 3 Stunden mit 90 ccm. Wasser und 10 ccm. Salzsäure von 1,12 D im Kolben im Wasserbad (in dieses versenkt) erhitzt, unter zeitweiligem Zusatz von ein wenig Wasser zum Ersatz des verdampften, erkalten gelassen, neutralisirt, auf 200 ccm. aufgefüllt und mit Fehling'scher Lösung titirt. Das Glycogen lieferte dabei 112,45% Glucose, was der Formel  $C_6H_{10}O_5$  entsprechen würde. In einem Kontrollversuch lieferte Glycogen, welches nach Fütterung mit Traubenzucker erhalten war, 111,19% Glucose. Diese Versuche sind von Dr. Austin angestellt und von ihm schon beschrieben.<sup>1)</sup>

Was die Angaben in der Litteratur betrifft; so fand Cremer l. c. S. 544 bei einem Huhn nach Arabinosefütterung 0,278 g Glycogen in der Leber, bei einem Kaninchen von 2836 g Endgewicht 0,928 g Glycogen. Ueber andere Pentosen liegen Versuche vor von Cremer (l. c. S. 544) mit Rhamnose und Xylose, von Joh. Frentzel<sup>2)</sup> mit Xylose. Nach Fütterung mit Rhamnose fand Cremer bei einem Huhn 0,208 g Leberglycogen, bei Kaninchen 0,42 — 0,426 — 3,102 g, nach Fütterung mit Xylose bei einem Huhn 0,843 g Leberglycogen. Während Cremer, ebenso wie ich, die Thiere vor dem Versuche hungern liess, wandte Frentzel eine complicirtere Versuchsanordnung an. Er machte die Kaninchen durch Strychninkrämpfe glycogenfrei, gab ihnen dann gleichzeitig mit der Xylose ein Schlafmittel und hüllte sie in Decken, um Verluste

---

1) Virchow's Arch., Bd. 150, S. 195.

2) Pflüger's Arch., Bd. 50, S. 273.

an Glycogen zu verhüten. Frentzel überzeugte sich, dass Traubenzucker unter diesen Umständen reichliche Glycogenbildung verursachte. Die Versuche mit Xylose gaben ein gänzlich negatives Resultat. Ob das nicht doch Schuld der Methode war, wenn sich auch aus Traubenzucker unter diesen Umständen Glycogen bildete, steht dahin. Jedenfalls erscheint es mir nicht angängig, das von Cremer nach Xylose-Fütterung gefundene Glycogen als Restglycogen zu betrachten, welches durch den Hunger nicht verbraucht war.

### 3. Sind die Pentosen, speciell die Arabinose Nährstoffe?

Da die Arabinose, nach Versuchen von Cremer auch die Rhamnose und Xylose, eine Anhäufung von Glycogen bewirken, welches als Nährstoff wieder verbraucht worden wäre, wenn das Thier am Leben geblieben wäre, so sind die Pentosen nach dieser Richtung beim Kaninchen unzweifelhaft Nährstoffe. Die Thatsache an sich ist sehr bemerkenswerth, da sonst keine Nährstoffe bekannt sind, von denen ein so erheblicher Theil den Körper unbenutzt verlässt. Ob auch derjenige Antheil der Pentosen, welcher im Körper ausserdem oxydirt wird, ernährende Wirkung hat, ist eine Frage, zu deren Beantwortung die experimentelle Grundlage — vergleichende Kohlensäurebestimmungen in der Expirationsluft — fehlt. Man könnte sich ja allerdings auf den Standpunkt stellen — er erscheint mir wenigstens discutabel — dass jede Substanz, welche oxydirt wird, also Wärme bildet, dem Körper zugute kommt, doch fällt eine solche Wirkung allein nach der gebräuchlichen Anschauung nicht unter den Begriff der Ernährung.

Ob die Pentosen, ebenso wie die Kohlehydrate mit 6 bezw. 12 Atomen Kohlenstoff, den Eiweisszerfall beschränken, also nach dieser Richtung hin ernährend wirken, ist gleichfalls noch nicht zu entscheiden. Es kann als feststehend angesehen werden, dass die Stickstoffausscheidung im Hunger sinkt, wenn man dem hungernden Thiere Kohlehydrate gibt, wiewohl Versuche speciell an Kaninchen nach dieser Richtung meines Wissens nicht vorliegen.

Überblickt man die in den Versuchen festgestellten Werthe für die N-Ausscheidung, so ergibt sich die N-Ausscheidung am Arabinosetage in einem Falle dem Hungerwerth gleich, nämlich 0,98 g gegenüber 0,974 im Hunger, in einem Versuche höher, nämlich 1,008 g gegenüber 0,605, in 3 Versuchen mehr oder weniger verringert, nämlich von 1,396 g auf 1,148 g, von 0,80 g auf 0,445 g, von 1,395 g auf 0,768 g. Man könnte demnach wohl von einer wenigstens unter Umständen eintretenden Beschränkung der Eiweisszersetzung sprechen, aber es ist sehr auffallend, dass auch die Werthe der Arabinosetage zum Theil immer noch höher sind, als diejenigen, welche Rostoski<sup>1)</sup> kürzlich an eiweissarm ernährten Kaninchen gefunden hat, wie die Durchsicht der Tabellen in der Arbeit von Rostoski ergibt.

Für den Menschen beobachteten Lindemann und May,<sup>2)</sup> dass beim Diabetiker unter dem Einfluss von 65 g verabreichter Rhamnose die Stickstoffausscheidung bei gleicher Diät von 17,0 auf 14,8 g herunterging, die Rhamnose also eiweiss sparend wirkte. Dagegen beobachtete v. Jaksch l. c. nach Einführung von Xylose beim Diabetiker eine enorme Steigerung des Eiweisszerfalles, eine Steigerung in einem Falle anscheinend auch nach Zufuhr von Rhamnose. Im Uebrigen möchte ich auf die Verhältnisse beim Menschen nicht eingehen, da mir kein eigenes Beobachtungsmaterial zur Verfügung steht, die Verhältnisse beim Menschen aber von Fr. Voit<sup>3)</sup> und namentlich von v. Jaksch eingehend untersucht sind.

---

Ich möchte noch einige bei der Untersuchung der Muskeln gemachte Betrachtungen nicht unerwähnt lassen.

1. 300 g Muskeln des Kaninchens VI wurde mit ca. 1 Liter Wasser wie zur Darstellung des Kreatins bei 50—60° extrahirt, filtrirt, abgepresst, auscoagulirt, eingedampft, mit Alkohol extrahirt, der abfiltrirte alkoholische Auszug bei gelinder Wärme

---

1) Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 432.

2) Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 56, S. 282, citirt nach Maly's Jahreshb. f. 1896, S. 336.

3) Deutsch. Arch. f. klin. Med., Bd. 58, S. 523.

verdunstet, nochmals mit Alkohol gefällt, filtrirt, verdunstet. Der Rückstand in Wasser gelöst zum Volumen von 50 ccm. Die Lösung gab starke Phloroglucinreaction, drehte aber trotzdem nicht rechts, sondern links und zwar im 10 cm.-Rohr an einem für Traubenzucker graduirten Halbschattenapparat entsprechend 0,4 %.

2. 300 g Muskeln des Kaninchens VII wurden ebenso verarbeitet. Von den erhaltenen 50 ccm. Lösung wurde ein Theil mit essigsauerm Blei behandelt, filtrirt und auf Polarisation untersucht. Auch diese Lösung drehte links und zwar entsprechend 0,6 % Traubenzucker; nach Behandlung mit Thierkohle sank die Drehung dieser Lösung auf 0,4 %. Der andere Theil wurde direkt bis zur völligen Entfärbung mit Thierkohle behandelt; Polarisation Null, Phloroglucinreaction fast Null.

3. Es lag nahe, die Polarisation nach links auf fleischmilchsaure Salze zu beziehen, welche sich in Folge des Hungerzustandes angehäuft haben mochten. Zur Kontrolle wurden 300 g Muskeln eines Kaninchens nach 5 tägigem Hunger ebenso behandelt, jedoch das Volumen der erhaltenen Lösung noch weiter, nämlich bis auf 20 ccm. reducirt. Die Lösung drehte gleichfalls links, aber nur etwa entsprechend 0,1 % Traubenzucker.

Die Natur dieses linksdrehenden Körpers muss einstweilen dahingestellt bleiben.

Wenn ich zum Schlusse meine Beobachtungen in einigen Sätzen zusammenfassen soll, so würden dieselben etwa folgendermaassen lauten:

1. Die l-Arabinose wird bei hungernden Kaninchen in Dosen von 10—15 g innerhalb 24 Stunden gut resorbirt, aber ein erheblicher Bruchtheil, im Mittel etwa 18,4 %, unverändert durch den Harn ausgeschieden.

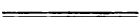
Die Arabinose schliesst sich danach, besonders aber nach ihrem Verhalten beim Menschen, den heterogenen Substanzen an, für welche es eine Assimilationsgrenze im Sinne Hofmeister's insofern nicht gibt, als auch schon von den kleinsten eingeführten Mengen etwas im Harn erscheint.

Glycogen ist das gewöhnliche und es liegt kein Grund vor, eine direkte Bildung von Glycogen aus Arabinose anzunehmen.

4. Die Arabinose ist, insofern sie Glycogen bildet, wenigstens bei Kaninchen als Nährstoff anzusehen; ob sie auch ausserdem noch kohlehydratsparend oder fettsparend wirkt, ist noch nicht zu sagen.

5. Die eiweiss sparende Wirkung der Arabinose ist zweifelhaft.

6. Die Muskeln enthalten bei Arabinose-Fütterung eine linksdrehende Substanz, deren Natur noch nicht festgestellt ist.



# Die Oxydationsprodukte des Arginins.

## II. Mittheilung.

Von

**Fr. Kutscher.**

---

(Aus dem physiologischen Institut zu Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 8. April 1901.)

---

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit haben Bénech<sup>1)</sup> und ich gezeigt, dass man durch vorsichtige Oxydation des Arginins aus demselben Guanidin gewinnen kann. Um auch die übrigen krystallinischen Oxydationsprodukte des Arginins zu isoliren, nahm ich eine grössere Menge Arginincarbonat, das mir Herr Professor Kossel zur Verfügung stellte, in Angriff. Das Verfahren, welches schliesslich zu einer annähernd vollkommenen Auftheilung der krystallinischen Oxydationsprodukte des Arginins führte, gestaltete sich wie folgt:

12 g lufttrockenes kohlensaures Arginin wurden in 250 ccm. Wasser gelöst, auf 25° C. erwärmt und langsam mit 36 g Baryumpermanganat, die in 500 ccm. Wasser gelöst waren, versetzt. Dabei erwärmte sich das Reaktionsgemisch auf 37° C. Die ganze Masse wurde darauf in einen auf 40° C. eingestellten Thermostaten gesetzt. Nach ca. 6 Stunden war vollkommene Entfärbung der Flüssigkeit eingetreten. Dieselbe wurde nun vom Manganschlamm abgesaugt, der Manganniederschlag sorgfältig mit heissem Wasser ausgewaschen. Das Filtrat vom Manganniederschlag wurde mit den Waschwässern vereinigt, in die Flüssigkeit Kohlensäure eingeleitet und sie darnach eingeengt, bis ihr Volumen ca. 300 ccm. betrug. Sie wurde jetzt mit Schwefelsäure stark angesäuert, darauf mit Phosphorwolframsäure vorsichtig ausgefällt. Der erhaltene Niederschlag

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 278.



säure kurz ausgewaschen. Ich will zunächst die Resultate, die die Verarbeitung der Phosphorwolframbfällung, dann diejenigen, welche das Filtrat vom Phosphorwolframniederschlag ergab, besprechen.

#### **Phosphorwolframniederschlag.**

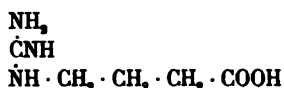
Der Phosphorwolframniederschlag wurde in Wasser aufgeschwemmt und mit Baryt zersetzt. Vom phosphorwolframsauren Baryt wurde abgesaugt, das Filtrat vom überschüssigen Baryt durch Kohlensäure befreit, stark eingengt und mit Schwefelsäure neutralisirt. Dabei schied sich neben etwas schwefelsaurem Baryt in dicken, weissen Flocken eine organische Substanz ab. Dieselbe wurde von mir, da die Ausbeute zu gering war, nicht näher untersucht. Vom schwefelsauren Baryt etc. wurde abfiltrirt. Das neue Filtrat wurde darauf mit kaltgesättigter Natriumpikratlösung gefällt. Das reichlich abgeschiedene Guanidinpikrat (es wurden 5 g Guanidinpikrat gewonnen) wurde nach 48 Stunden abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen.<sup>1)</sup>

Das Filtrat vom Guanidinpikrat wurde mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit 5%iger Schwefelsäure ausgewaschen, in Wasser aufgeschwemmt und mit Baryt zersetzt. Der phosphorwolframsaure Baryt wurde abgesaugt, in der Flüssigkeit der überschüssige Baryt durch Kohlensäure niedergeschlagen. Vom kohlensauren Baryt wurde abfiltrirt, das Filtrat stark eingengt. Es setzte sich sehr bald am Boden der Krystallisationsschale eine feste Krystallkruste ab. Die überstehende Mutterlauge wurde abgegossen, die Krystallmasse in heissem Wasser gelöst und mit etwas Thierkohle entfärbt. Nach gehöriger Concentration schieden sich jetzt aus der entfärbten Flüssigkeit kleine stark glänzende, zu Drusen vereinigte Krystalle ab. Dieselben waren in heissem Wasser leicht, in kaltem dagegen schwer löslich, in Alkohol unlöslich. Schon an der Luft verloren sie ihren Glanz. Im Exsiccator über Schwefelsäure zerfielen sie zu weissem Pulver. Bei 100° C.

---

<sup>1)</sup> Siehe Emich, Monatshefte für Chemie, Bd. 12.

gaben sie im Trockenschrank lebhaft Wasser ab. Gegen Lackmus reagierten sie schwach alkalisch. Sie wurden, wie die Analyse ergab, von der bisher nicht bekannten  $\gamma$ -Guanidinbuttersäure



gebildet.

Da das Trocknen der freien Guanidinbuttersäure Schwierigkeiten machte, benutzte ich für die Analyse ihre Verbindung mit Salzsäure. Um diese darzustellen, hat man nur nöthig, die Guanidinbuttersäure in etwas heisse concentrirte Salzsäure einzutragen. Beim Erkalten krystallisirt sofort die Verbindung  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$  aus. Dieselbe ist in Wasser leicht, in kalter verdünnter, sowie concentrirter Salzsäure dagegen schwer löslich, in Alkohol unlöslich. Sie schmilzt bei  $184^\circ \text{C}$ . (uncorrig.) scheinbar unzersetzt, denn die Schmelze erstarrt nach dem Erkalten wieder zu einer Krystallmasse, deren Schmelzpunkt unverändert geblieben ist. Die im Exsiccator über Schwefelsäure vorgetrocknete Substanz verlor beim Erwärmen auf  $130^\circ \text{C}$ . nichts an Gewicht.

0,1712 g Substanz lieferten mit Kupferoxyd gemischt bei der Verbrennung 0,2098 g  $\text{CO}_2$  und 0,1053 g  $\text{H}_2\text{O}$ ,

0,1527 g Substanz gaben bei der volumetrischen Stickstoffbestimmung 30.8 ccm. N, T. =  $12^\circ \text{C}$ ., Ba. = 750. Sperrflüssigkeit 25% Kalilauge,

0,1041 g Substanz gaben 0,0825 g  $\text{AgCl}$ .

Für  $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{HCl}$ :

Berechnet:	Gefunden:
C = 33,06 %	C = 33,44 %
H = 6,61 %	H = 6,88 %
N = 23,14 %	N = 23,73 %
Cl = 19,56 %	Cl = 19,60 %

Die Ausbeute an Guanidinbuttersäure hatte ca. 1 g betragen.

#### Filtrat vom Phosphorwolframniederschlag.

Das Filtrat vom ersten Phosphorwolframniederschlag wurde mit Baryt von der überschüssigen Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit, der überschüssige Baryt genau durch Schwefelsäure entfernt. Darnach wurden die vom phos-

stark concentrirt zur Krystallisation aufgestellt. Es schieden sich bald glänzende Blättchen ab, die von der geringen Mutterlauge abgesaugt und nach der Entfärbung durch Thierkohle aus Wasser umkrystallisirt wurden. Analyse sowie Schmelzpunktbestimmung erwiesen die Krystalle als Aethylenbernsteinsäure.

0,1389 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,2066 g  $\text{CO}_2$  und 0,063 g  $\text{H}_2\text{O}$ .

Für  $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ :

Berechnet:

C = 40,68 %

H = 5,08 %

Gefunden:

C = 40,58 %

H = 5,07 %.

Ein Theil der Krystalle wurde in das Silbersalz übergeführt. Es gaben 0,1294 g Silbersalz 0,0838 g Ag.

Für  $\text{C}_4\text{H}_4\text{Ag}_2\text{O}_4$ :

Berechnet:

Ag = 65,02 %

Gefunden:

Ag = 64,76 %.

Die Krystalle der freien Säure schmolzen bei  $183^\circ \text{C}$ . (uncorr.). Ein von Kahlbaum bezogenes Präparat von Aethylenbernsteinsäure schmolz am gleichen Thermometer unter denselben Bedingungen bei  $185^\circ \text{C}$ . Auch die qualitativen Reactionen wie Sublimirbarkeit etc. stimmten mit jenen der Aethylenbernsteinsäure vollkommen überein.

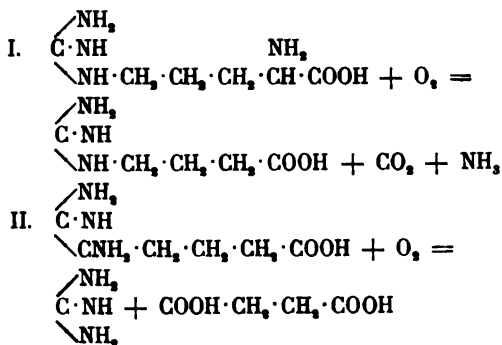
Die Ausbeute an Bernsteinsäure hatte nur ca. 0,8 g betragen. In Wirklichkeit bildet sich bei der Oxydation des Arginins durch Baryumpermanganat jedenfalls weit mehr Bernsteinsäure, als von mir isolirt wurde, doch muss der grösste Theil derselben sofort in Form von bernsteinsaurem Baryt niedergeschlagen werden und im Manganschlamm sowie den späteren Barytniederschlägen stecken bleiben. Es hat demnach wahrscheinlich die Unvollkommenheit der von mir benutzten Oxydationsmethode es verschuldet, dass die Menge der gewonnenen Bernsteinsäure weit hinter der theoretisch berechneten zurückgeblieben ist.

Die Mutterlauge von der Bernsteinsäure setzte nach einiger Zeit noch eine geringe Menge einer in langen Nadeln krystallisirenden Substanz ab. Die Krystalle waren in kaltem Wasser schwer löslich, in Alkohol vollkommen unlöslich. Um

sie zu identificiren, reichte ihre Menge nicht hin. Nach ihrer Abscheidung verblieb eine geringe schmierige Mutterlauge, die nicht weiter zugänglich war.

Die von mir bei der Oxydation des Arginins erhaltenen Resultate bringen eine vollkommene Bestätigung der von Schultze, Winterstein<sup>1)</sup> und Ellinger<sup>2)</sup> über die Constitution des Arginins bzw. Ornithins ausgesprochenen Ansichten. Namentlich beseitigen sie den Einwand, den man gegen die originelle Methode Ellinger's<sup>3)</sup> erheben kann, nämlich, dass bei seinen Arbeiten das Tetramethyldiamin aus dem Ornithin nicht durch Spaltung entstanden, sondern synthetisch von den Bakterien dargestellt worden ist. Weiterhin geben sie natürlich den Arbeiten Ellinger's bezüglich der Constitution des Lysins eine starke Stütze.

Die Oxydation des Arginins muss sich, darauf deutet die Auffindung der Guanidinbuttersäure, in zwei Phasen vollziehen, deren erste zur Bildung der Guanidinbuttersäure führt, die dann weiter in Guanidin und Bernsteinsäure zerfällt. Diese Vorgänge lassen sich in folgenden Formeln ausdrücken:



Die Atomgruppierung in der Guanidinbuttersäure ergibt sich ohne Weiteres, sobald man die krystallinischen End-

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 1 und Ber. der deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 30, S. 2879 und Bd. 32, S. 3191.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 334 und Ber. der deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 31, S. 3183 und Bd. 32, S. 3542.

3) l. c.

Aethylbernsteinsäure mit in die Betrachtung zieht.

Das Auffinden der Bernsteinsäure unter den Oxydationsprodukten des Arginins gestattet weiterhin, einer Frage näher zu treten, die bereits von Gorup-Besanez aufgeworfen worden ist. Gorup-Besanez<sup>1)</sup> hat bekanntlich die Bernsteinsäure in der Thymusdrüse des Kalbes, in der Thyreoidea und Milz des Rindes nachgewiesen. An diesen Befund knüpft er folgende Betrachtungen.<sup>2)</sup> «Nach diesen Erwägungen dürfte es wohl gerechtfertigt sein, die Bildung der Bernsteinsäure im Laufe der Untersuchung zu bezweifeln und vielmehr anzunehmen, dass diese Säure constant oder in gewissen Functionsphasen ein Bestandtheil der Milz, Thymus und Thyreoidea sei. Dass sie in diesem Falle eines der immer zahlreicher sich erweisenden Glieder der regressiven Stoffmetamorphose sein müsse, lässt sich nach allen gegebenen physiologischen und chemischen Daten wohl nicht bezweifeln; aus welchem Körper sie aber zunächst entstehe, ist gegenwärtig auch nicht einmal annähernd zu bestimmen. Es könnte eben so gut sein, dass sie aus gewissen stickstofffreien Verbindungen durch Oxydationsvorgänge entstände, als es andererseits denkbar wäre, dass sie aus stickstoffhaltigen Körpern durch Spaltung gebildet würde.»

Die von Gorup-Besanez gestellte Frage nach den Muttersubstanzen der im thierischen Organismus gefundenen Bernsteinsäure können wir zur Zeit, nachdem es Gulewitsch und Jachelsohn<sup>3)</sup> gelungen ist, in der Milz als Produkt des regressiven Stoffwechsels das Arginin mit Hülfe der Methode Kossel's nachzuweisen, wenigstens theilweise beantworten. Denn seit wir die Bernsteinsäure als Oxydationsprodukt des Arginins kennen gelernt haben, dürfen wir zweifellos das während der regressiven Stoffmetamorphose gebildete Arginin als eine Quelle der im Organismus auftretenden Bernsteinsäure ansprechen und somit dieselbe auf den Hexonkern des Eiweissmoleküls zurückführen.

---

1) Annalen der Chemie und Pharmacie, Bd. 98, S. 1 ff.

2) l. c., S. 33.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 533.

## Ueber das Hefetrypsin.

Von  
**Fr. Kutscher.**

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)  
(Der Redaction zugegangen am 8. April 1901.)

In seiner Arbeit «Ueber das Invertin der Hefe» hat Salkowski<sup>1)</sup> auch einige Bemerkungen bezüglich des Hefetrypsins gemacht, die ich berichtigen muss. Salkowski schreibt in seiner Veröffentlichung: «Bei meinen Versuchen über die Autodigestion der Hefe habe ich drei bisher unbekannte Enzyme in der Hefe aufgefunden: 1. ein eiweissspaltendes, welches in seiner Wirkung dem Trypsin sehr nahe steht, jedoch mit dem Unterschied, dass es noch energischer spaltend zu wirken scheint, da die digerirte Flüssigkeit nichts Wesentliches von Albumosen oder Pepton enthält. M. Hahn und Geret haben dasselbe kürzlich aus Hefepresssaft isolirt und festgestellt, dass es sich von dem Trypsin dadurch unterscheidet, dass es am besten bei saurer Reaction wirkt.»

Als Beleg für diesen Satz führt Salkowski seine Arbeiten im Centralblatt f. d. med. Wissenschaften 1889, No. 13, in dieser Zeitschrift, Bd. XIII, S. 506 und in der Zeitschrift f. klin. Med., Suppl. z. Bd. 17, S. 77, 1890, auf. Sieht man jedoch die betreffenden Arbeiten durch, so findet man keine Angaben, die Salkowski gestatten, oben citirten Satz in der Form auszusprechen, in der er es gethan hat. Man erfährt aus denselben nur, dass bei der Autodigestion der Hefe mit Chloroformwasser Albumosen, Pepton, Leucin, Tyrosin, Alloxurbasen und Phosphorsäure in die Digestionsflüssigkeit übergehen. Die Bildung dieser Substanzen führt Salkowski auf einen Fermentvorgang zurück. Ueber die Natur des Fermentes sagt Salkowski dagegen nichts. Und doch hätte

---

<sup>1)</sup> Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 323 ff.

weise des Trypsins mit einigem Recht behaupten können, dass das in den Hefezellen enthaltene proteolytische Enzym ein tryptisches sei.

Nachdem ich aber die Anschauung Kühne's über die Wirkung des Trypsins als irrig erwiesen habe und da die Spaltungsprodukte, die Salkowski bei der Autodigestion der Hefe erhalten hatte, nicht charakteristisch für die Wirkungsweise des Trypsins sind, durfte Salkowski auf Grund seiner Arbeiten gar nicht mehr behaupten, das Enzym in der Hefe sei ein tryptisches.

Wenn Salkowski aber gar noch nach Empfang meiner Arbeit,<sup>1)</sup> in der ich die Belege dafür erbracht habe, dass das proteolytische Enzym der Hefe ein dem Trypsin identisches oder nahe verwandtes sei, die Behauptung aufstellt, er habe in der Hefe ein eiweisspaltendes Enzym, welches in seiner Wirkung dem Trypsin sehr nahe steht, festgestellt, so scheint mir die von Salkowski benutzte Ausdrucksweise in doppelter Hinsicht sehr unglücklich gewählt. Denn erstens gibt dieselbe weit mehr, als den von Salkowski erhaltenen Resultaten entspricht, und zweitens muss, da Salkowski meine Arbeit, auf die gestützt er Angaben über die Natur des proteolytischen Hefenzyms machen konnte, nicht citirt, der Eindruck entstehen, als ob Salkowski mich absichtlich nicht als den Autor nennt, dessen Arbeit endgültige Aufklärung über die Natur des Hefetrypsins gegeben hat, um seine Untersuchungen als weitgehender erscheinen zu lassen, wie sie es in Wirklichkeit sind.

Darüber also, dass Salkowski nicht die Natur des proteolytischen Enzyms der Hefezellen festgestellt hat, kann nach Vorstehendem kein Zweifel sein und es fragt sich nur noch, ob Salkowski, wie er behauptet, das proteolytische Enzym in den Hefezellen entdeckt hat. Ich habe dazu in den Sitzungsberichten der Gesellschaft zur Beförderung der gesammten Naturwissenschaften zu Marburg Folgendes geschrieben: «Die

---

1) Aus den Sitzungsberichten der Gesellsch. z. Beförd. der ges. Naturw. zu Marburg, Juni 1900.

ersten Angaben, welche auf das Vorhandensein starker proteolytischer Enzyme im Inneren der Hefe hinweisen, verdanken wir Schützenberger (Bull. de la soc. chimique de Paris, T. 21, 1874, S. 194 u. 204, weiter «Die Gährungserscheinungen» 1876) und Kossel (Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. IV, S. 294 und Bd. VII, S. 17). Die beiden genannten Forscher überliessen gewaschene Hefe der Selbstgährung bei 37—40° und konnten danach eine starke Zunahme der wasserlöslichen Substanzen feststellen. Unter denselben fanden sich in reichlicher Menge Tyrosin, Leucin, freie Alloxurbasen und freie Phosphorsäure. Es sind das lauter Substanzen, die nur aus zersetzten Nucleinen und Eiweisskörpern der Hefe stammen konnten. Die folgenden Arbeiten von Salkowski (Zeitschrift f. physiol. Chemie, Bd. XII, S. 506 und Zeitschrift für klinische Medicin, Bd. 17, Suppl.) und Hahn (Ber. d. deutsch. chemisch. Gesellschaft, Bd. 31, S. 200 u. 2335) haben über die Natur des proteolytischen Enzyms in der Hefe und den Abbau, den die Eiweisskörper durch denselben erfahren, nichts wesentlich Neues ergeben.»

Diese Sätze versucht Salkowski zurückzuweisen, ohne selbst jetzt sich die nöthigen Kenntnisse der Schützenberger'schen Arbeiten zu verschaffen. Würde er dies gethan haben, so würden ihm wahrscheinlich seine eigenen Untersuchungen als das erscheinen, wofür ich sie ansehe, nämlich als Wiederholungen älterer, hauptsächlich Schützenberger'scher Versuche.

Da aber Salkowski die Arbeiten Schützenberger's immer noch nicht kennt, muss ich auf dieselben etwas näher eingehen. Sowohl Béchamp, wie Schützenberger<sup>1)</sup> überliessen zunächst gewaschene überlebende Hefe sich selbst und constatirten dabei die reichliche Bildung von Leucin, Tyrosin, Alloxurbasen, Alkohol und Kohlensäure. Um Infusorienbildung auszuschliessen, wandten sie später Kreosotwasser an, unter dem die Hefe die gleichen Erscheinungen zeigte. Schon Schützenberger<sup>1)</sup> gab für die eben genannten Processe,

---

1) Die Gährungserscheinungen, Leipzig 1876.



tenen Hefe abspielen, eine Erklärung, der wir auch heute nur beistimmen können. Er schreibt darüber in Theil II der Gährungserscheinungen, S. 266, nachdem er die Pepsin- und Trypsinverdauung abgehandelt hat: «Die Analogie der Functionen gab Bernard Veranlassung, auch im Pflanzenreich nach einer Eiweissverdauung zu suchen. Verstehen wir mit Bernard darunter jeglichen Uebergang albuminoider Substanzen in lösliche diffusible Körper, dann kommt sie sicherlich auch im Pflanzenreiche vor. Bei der Alkoholgährung wurde der Erscheinungen gedacht, die man an einer der Inanition überlassenen und feuchtgehaltenen Hefe beobachtet: sie dürfen nur als wirkliche Verdauung von Porteinsubstanzen gedeutet werden.»

Nach den citirten Versuchen von Béchamp und Schützenberger sowie der Erklärung Schützenberger's war es klar, dass es sich dabei nur um einen Fermentvorgang handeln konnte. Es war so klar und selbstverständlich, dass es eigentlich gar nicht mehr gesagt zu werden brauchte. Die Versuche Salkowski's, der an Stelle von Kreosotwasser Chloroformwasser setzte, im Uebrigen aber zu den gleichen Resultaten wie Béchamp und Schützenberger kam, können daher nur als eine Wiederholung und unwesentliche Modification älterer Versuche gelten.

Nun behauptet Salkowski allerdings, die Versuche, in denen Schützenberger und Béchamp mit Kreosotwasser arbeiteten, wären von mir nicht in Betracht gezogen worden. Salkowski schreibt dazu: «Diese Versuche hat aber Kutscher sicher nicht im Auge gehabt, denn er spricht nur von Selbstgährung und dass diese nicht die Existenz eines eiweissspaltenden Epzyms beweist, liegt auf der Hand.» Ich schreibe jedoch in meiner Abhandlung ausdrücklich: «Die folgenden Arbeiten von Salkowski und Hahn haben über die Natur des proteolytischen Enzyms in der Hefe und den Abbau, den die Eiweisskörper durch dasselbe erfahren, nichts wesentlich Neues ergeben.» In vorstehendem Satz glaubte ich mich so deutlich wie nur möglich ausgesprochen zu haben. Ich

habe mich, wie ich sehe, geirrt, und muss daher Salkowski erklären, dass, wenn ich nur an die Selbstgährung der überlebenden Hefe gedacht hätte, ich logischer Weise hätte schreiben müssen: «Die folgenden Arbeiten von Salkowski und Hahn haben bezüglich der Selbstgährung nichts Neues ergeben.» Aber gerade weil ich die Versuche von Schützenberger und Béchamp mit Kreosotwasser, sowie die Erklärung derselben durch Schützenberger kannte, durfte ich schreiben: «Die folgenden Arbeiten von Salkowski und Hahn haben bezüglich der Natur des proteolytischen Enzyms in der Hefe nichts wesentlich Neues ergeben.» Die einzelnen Versuche Schützenbergers aufzuführen, verbot die Form der Mittheilung meines Vortrages, die die Kürze eines Referates hat.

Weiterhin würde Salkowski, vorausgesetzt, er besässe die nöthige Litteratur-Kenntniss, verständlich sein, warum ich die Arbeiten Kossel's im Zusammenhang mit denjenigen Schützenberger's citirt habe. Er würde sehen, dass die Arbeiten Kossel's denen Schützenberger's nicht vorausgehen, sondern folgen und die richtige Erklärung geben für die Herkunft der Alloxurbasen und der Phosphorsäure, die bei der Selbstverdauung der Hefe entstehen.

Zum Schluss wirft mir Salkowski vor, ich hätte mir die Chloroformwasserdigestion der Hefe aneignen wollen, weil ich ihn nicht ausdrücklich als Autor derselben nenne. Er hätte mir mit demselben Recht auch vorwerfen können, dass ich Schützenberger und Béchamp um die Kreosotwasserdigestion der Hefe, wovon die Chloroformwasserdigestion nur eine Modification ist, bringen wollte. Denn auch ~~ich~~ ~~habe~~ ich nicht näher erwähnt, trotzdem mich bei meinen ganzen von Salkowski beanstandeten Ausführungen nur das Bestreben geleitet hat, den von Salkowski nicht gekannten Arbeiten Schützenberger's gerecht zu werden und sie bekannt zu machen.

Dass mir aber die von Salkowski untergeschobene Absicht vollkommen gefehlt hat, geht wohl am klarsten aus der Zusendung meiner Arbeit an Salkowski hervor. In dieser habe ich ausserdem die beiden Arbeiten Salkowski's über

formwassermeinde zur Schlinge hervorhebt, genau dasselbe.  
Im Uebrigen war und ist es für meine Methode vollkommen gleichgültig, ob ich mich des Chloroformwassers bei der Selbstverdauung der Hefe bediente. Ich hätte ebenso gut Kreosotwasser oder salicylsaures oder ätherhaltiges Wasser, das von Kühne<sup>1)</sup> und Hoppe-Seyler<sup>2)</sup> schon vor Salkowski mit gutem Erfolg bei der Autodigestion des Pankreas benutzt wurde, anwenden können. Ich hätte sogar mit überlebender Hefe arbeiten können und wäre wahrscheinlich auch damit zum Ziele gelangt. Denn meine Methode beruht darauf, die für die Thätigkeit eines Enzyms charakteristischen Spaltungsprodukte zu isoliren und aus denselben die Natur des Enzyms zu erschliessen.

Ich muss daher die Reclamation Salkowski's, nach der meine Arbeit über das Hefetrypsin eine Fortsetzung seiner Untersuchungen sein soll, zurückweisen. Sie ist, daraus habe ich kein Hehl gemacht, eine Fortsetzung der Versuche von Schützenberger und Kossel. Eine Fortsetzung der Arbeiten Salkowski's kann sie nicht sein, weil diese lediglich eine Wiederholung der Veröffentlichungen von Schützenberger und Kossel darstellen, die nur Salkowski und anderen, welche die einschlägige Litteratur nicht kennen, neu erscheinen.

---

1) Verhandl. des naturhist.-med. Vereins zu Heidelberg, N. F., Bd. 1, 1877.

2) Diese Zeitschrift. Bd. VIII, S. 130.

## **Notiz über den aus Cerebrin abspaltbaren Zucker.**

Von

**Fr. N. Schulz und Fr. Ditthorn.**

---

(Aus der chem. Abtheilung des physiologischen Instituts zu Jena.)

(Der Redaction zugegangen am 9. April 1901.)

---

Aus Cerebrin lässt sich durch Kochen mit Säure ein krystallisirbarer Zucker gewinnen. Thierfelder<sup>1)</sup> hat denselben dargestellt und auf Grund seiner physikalischen Constanten (Schmelzpunkt, Drehungsvermögen), der elementaren Zusammensetzung, der Bildung von Galactosazon mit Phenylhydrazin, sowie der Ueberführbarkeit in Schleimsäure als identisch mit der gewöhnlichen Galactose angesprochen. In der That berechtigen die gefundenen Werthe zu dieser Annahme. Da die neueren Untersuchungen ergeben haben, dass durchweg die in die Organisation des thierischen Körpers aufgenommenen Kohlehydrate, im Gegensatz zu dem als Reservestoff functionirenden Glycogen bezw. Traubenzucker, durch Säuren als amidirte Zucker abgespalten werden (z. B. Glycosamin aus Chitin, Chondrin, Mucin, Albumin), so lag die Vermuthung nahe, dass auch die Galactose des Cerebrins ein amidirter Zucker, ein Galactosamin sei.

Die Bildung von Galactosazon konnte nicht als Beweis für Thierfelder's Annahme gelten, da ja auch das Glycosamin mit Phenylhydrazin gewöhnliches Glucosazon liefert.

Auffallend ist allerdings die gute Uebereinstimmung des Schmelzpunktes sowie des optischen Verhaltens des isolirten Zuckers mit den für Galactose gefundenen Werthen. Wenn

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XIV, 1889, S. 206.

Glucose nur geringe Differenzen in den erwähnten Werthen bieten (noch dazu ohne dass sich eine Identität zwischen dem Kohlehydrat, welches dem Glycosamin zu Grunde liegt, und der gewöhnlichen Glycose feststellen liesse), dass ferner Thierfelder bei den ausserordentlichen Schwierigkeiten in der Materialgewinnung sicher nur geringe Mengen des Gehirnzuckers in reiner Form zur Verfügung hatte, so wird man unsere Bedenken für gerechtfertigt halten.

Da die C- und H-Bestimmung nur durch mehrere Analysen und bei völlig reinem Material eine Entscheidung darüber, ob es sich um einen Zucker  $C_6H_{12}O_6$  oder  $C_6H_{12}NO_5$  handelt, herbeiführen kann (Thierfelder hat anscheinend nur so viel Material unter Händen gehabt, dass er eine C- und H-Bestimmung ausführen konnte), so hielten wir es für zweckmässig, den angedeuteten Zweifel durch das einfache Mittel einer Stickstoffbestimmung zu beheben.

Wir stellten uns reines Cerebrin aus Rinderhirn dar durch Verseifen von Protagon mit methylalkoholischer Barytlösung nach der Methode von Kossel und Freitag.<sup>1)</sup> Das reine Cerebrin wurde im Einschlussrohr durch 5 stündiges Erwärmen mit der 10fachen Menge 2%iger Schwefelsäure auf 125° gespalten, wobei die reducirende Substanz in die wässrige Lösung übergeht. Die abfiltrirte wässrige Lösung wurde mit Baryt genau ausgefällt, durch Kochen mit Thierkohle völlig entfärbt, dann zur Syrupconsistenz auf dem Wasserbade eingengt. Durch Zusatz von Alkohol und etwas Aether wurde die Abscheidung harter makroskopischer Krystalle von weisser Farbe und süssem Geschmack erzielt, die identisch sind mit den von Thierfelder als Galactose angesprochenen.<sup>2)</sup>

Die Stickstoffbestimmung, nach Kjeldahl an 2 verschiedenen Präparaten ausgeführt, ergab nun, dass die Krystalle

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, 1892, S. 440.

2) Als wir die Gehirnmasse direkt mit Baryt verseiften und dann durch heissen Alkohol Cerebrin extrahirten, erhielten wir ein unreines Cerebrin, welches bei der Säurespaltung schlecht krystallisirenden Zucker lieferte, der mit einer stickstoffreichen Substanz verunreinigt war.

frei von Stickstoff waren. Es handelt sich also thatsächlich um Galactose, wie Thierfelder von vornherein annahm.

Wir haben somit anscheinend eine Ausnahme von der sonst gültigen Regel vor uns, dass die Derivate des thierischen Organismus bei der Säurespaltung amidirte Kohlehydrate liefern. Zu bedenken ist jedoch, dass das Cerebrin nicht die native Verbindung darstellt, sondern erst durch Kochen mit Baryt aus dem Protagon entstanden ist.

Es sei noch bemerkt, dass die bei der Spaltung angewandte Schwefelsäure nicht etwa die Amidogruppe erst nachträglich abgespalten hat, wie man aus dem Verhalten des Isoglycosamins etwa entnehmen könnte. Um dies festzustellen, wurde die Spaltungsflüssigkeit mit Natronlauge alkalisirt und durch Destillation in eine vorgelegte  $\frac{1}{10}$ -Normalsäure auf flüchtiges Alkali geprüft. Hierbei ging kein Ammoniak über.

---

## Weiteres über Galactosamin.

Von

Fr. N. Schulz und Fr. Dittborn.

---

(Aus der chemischen Abtheilung des physiologischen Instituts zu Jena.)

(Der Redaction zugegangen am 9. April 1901.)

---

Bei Untersuchung des Zuckers, der durch stärkere Säuren aus dem Glycoproteid der Eiweissdrüse des Frosches abgespalten wird, konnten wir Befunde erheben, aus denen wir schlossen, dass es sich um ein Galactosamin handele.<sup>1)</sup>

Da die Reindarstellung ausreichender Mengen dieses Zuckers auf grosse, bisher nicht überwundene Schwierigkeiten stiess, so versuchten wir zunächst auf indirektem Wege weiter zu kommen, durch den Versuch, auf andere Weise Galactosamin zu gewinnen.

Es war uns seiner Zeit entgangen, dass der Name Galactosamin eigentlich schon anderweitig vergeben ist. Lobry de Bruyn und van Leent haben unter diesem Namen einen Körper beschrieben, der durch Einwirkung von  $\text{NH}_3$  in methylalkoholischer Lösung auf Galactose entsteht, und dem die Zusammensetzung  $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5$  zugeschrieben wird.<sup>2)</sup> Ausser einem Galactosamin sind noch Ammoniakverbindungen mehrerer anderer Zucker in analoger Weise von den Verfassern her-

---

1) Fr. N. Schulz und F. Dittborn, Galactosamin, ein neuer Amidozucker, als Spaltungsprodukt des Glycoproteids der Eiweissdrüse des Frosches. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, 1900, S. 373.

2) a. Fr. H. van Leent, «Ueber Milchzucker, Galactose und Maltose und ihre Ammoniakverbindungen». Inaug.-Diss., Basel, 1894.

b. C. A. Lobry de Bruyn et F. H. Leent, Dérivés ammoniaux de quelques sucres. Recueil des Travaux chimiques des Pays-Bas. 1895. Tome XIV, S. 140 ff.

gestellt worden. Alle diese Ammoniakverbindungen von Kohlehydraten unterscheiden sich von dem Glycosamin durch die lockere Bindung des Ammoniaks. Schon beim Stehen der wässrigen Lösung sowie bei Berührung der festen Substanz mit Luft wird  $\text{NH}_3$  abgespalten. Durch verdünnte Säuren (auch organische, z. B. Oxalsäure) wird das locker gebundene  $\text{NH}_3$  quantitativ frei gemacht. Es gelingt demnach nicht, Salze dieser Ammoniakzucker mit Säuren darzustellen. Umgekehrt ist das Glycosamin nur unter besonderen Vorsichtsmassregeln als freie Base zu erhalten, während es mit Säuren prächtig krystallisierende Salzverbindungen eingeht und dementsprechend nur sehr schwer  $\text{NH}_3$  abspaltet.

In mancher Beziehung in der Mitte zwischen diesen beiden Gruppen von Ammoniakverbindungen der Kohlehydrate stehen die von Emil Fischer<sup>1)</sup> auf anderem Wege dargestellten Amidozucker, das Isoglucosamin und das Akrosamin, beide durch Reduction des betreffenden Osazons mit Zink und Eisessig gewonnen. Diese letzteren sind als freie Basen bisher nicht dargestellt; sie enthalten das Ammoniak in ziemlich fester Bindung, so dass es gelingt, Salze mit organischen Säuren (Acetat und Oxalat des Isoglycosamins, Oxalat des Akrosamins) herzustellen. Beim Behandeln mit Mineralsäuren tritt dagegen eine Abspaltung von  $\text{NH}_3$  ein, und es ist bisher nicht gelungen, Verbindungen mit Mineralsäuren darzustellen.

De Bruyn und van Leent gaben selbst an, dass ihre Ammoniakderivate sich in ihrer Constitution von den drei anderen damals bekannten Osaminen (Glycosamin, Isoglycosamin, Akrosamin) unterscheiden (S. 142 Anm.). Es dürfte daher wohl zweckmässig sein, die Bezeichnung Osamine für solche Zucker zu reserviren, die durch die festere Bindung des  $\text{NH}_3$  (Salzbildung mit Säuren) als zu einer Gruppe gehörend sich documentiren; zu diesen würde auch das von uns vermuthete Galactosamin zu zählen sein.

---

1) a. Emil Fischer, Ueber Isoglucosamin. Chem. Ber., Bd. 19, 1886, S. 1920.

b. E. Fischer und J. Tafel, Synthetische Versuche in der Zuckergruppe. Chem. Ber., Bd. 20, 1887, S. 2566—2575.



den Erweis zur Darstellung des Fisches darstellbaren Zucker zu gewinnen, gingen wir in ganz analoger Weise vom Galactosazon aus, wie Emil Fischer aus Glucosazon und Akrosazon das Isoglucosamin und das Akrosamin darstellte,<sup>1)</sup> in der Hoffnung, so ein Galactosamin zu erhalten.

100 g Galactose (Kahlbaum), in 1 l. Wasser gelöst, wurden mit 100 g Phenylhydrazin und 100 g Essigsäure mehrmals längere Zeit gekocht und die beim Erkalten abgeschiedenen Krystalle jedesmal abfiltrirt, mit Wasser gewaschen und auf Thonplatten an der Luft getrocknet. Die Ausbeute betrug in mehreren Darstellungen je 50 g Galactosazon.

50 g Galactosazon, mit 100 ccm. Wasser und 300 ccm. Alkohol absolutus verrieben, unter allmählichem Zusatz von 125 g Zinkstaub und 50 g Eisessig bei 50° reducirt. Nachdem die sichtbaren gelben Osazonpartikel vollständig verschwunden, wurde abfiltrirt. Das Filtrat wurde mit  $\text{SH}_2$  vom Zink befreit. Diese Procedur erfordert Geduld; das sehr voluminöse ZnS musste mehrmals abfiltrirt und zur Vermeidung von Verlusten mit Alkohol (1:3 wie oben) ausgewaschen werden. Trotzdem war dieses Entzinken sicher mit bedeutenden Verlusten verbunden. Das völlig zinkfreie Filtrat wurde bei 50° unter möglichst vermindertem Druck zum Syrup eingedampft und dann mit reichlich Alkohol und viel Aether gefällt. Der abgeschiedene Syrup zeigte keine Neigung, spontan krystallinisch zu werden. Nach mehrtägigem Stehen wurde von dem zähen Syrup abdecantirt; der Syrup wurde in wenig Wasser gelöst (wobei er sich fast völlig auflöste) und filtrirt.

Das Filtrat wurde mit dem 20–30fachen Volumen Alkohol absolutus versetzt. Hierdurch wurde eine geringe Trübung, aber keine nennenswerthe Fällung erzielt.

Das Galactosamin wird also, falls es bei der Reduction des Galactosazons sich bildete, als Acetat aus wässriger Lösung nicht gefällt, im Gegensatz zum Isoglucosaminacetat. Aehnlich verhält sich nach E. Fischer das Akrosamin, dessen Acetat auch nicht krystallisirt. Da das Akrosamin dagegen ein krystallisirendes Oxalat bildet, und auch das Isoglucosamin-

---

<sup>1)</sup> So weit wir sehen, ist (ausser einem nicht weiter verfolgten Versuch mit Lactosazon von Emil Fischer) dies Verfahren nicht anderweitig zur Darstellung von Amidozuckern benutzt worden, obgleich schon Fischer ausdrücklich auf die Bedeutung derartiger Verbindungen für den Physiologen hinwies und die Hoffnung aussprach, dass auf diesem Wege eine grössere Anzahl von Ammoniakderivaten der Zuckerarten zu gewinnen sei.

oxalat durch Alkohol leichter gefällt wird, wie das Isoglucosaminacetat, so wurde die wässerig alkoholische Lösung des vermutheten Galactosaminacetats mit alkoholischer Oxalsäure versetzt. Hierdurch liess sich eine reichliche, voluminöse, schön krystallinische Fällung erzielen. Dieselbe wurde abfiltrirt, in wenig Wasser gelöst und nochmals mit Alkohol gefällt. Hierbei zeigte es sich, dass zwei verschieden leicht fällbare Substanzen in der Lösung vorhanden waren.

Die leichter fällbare Substanz, durch mehrfaches Fractioniren mit Alkohol soweit gereinigt, dass sie Fehling'sche Lösung nicht mehr reducirte, erwies sich durch ihre Eigenschaften sowie durch Elementaranalyse als Ammoniumoxalat. Das Ammoniak bildet sich in reichlichen Mengen bei der Reduction des Osazons, die sich nach der Gleichung

$$\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_4 + \text{H}_2\text{O} + 6\text{H} = \text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5 + \text{NH}_3 + 2 \text{C}_2\text{H}_5\text{NH}_2$$

vollzieht.

Der schwer fällbare Theil enthielt den gesuchten Zucker. Der Versuch, denselben durch Entfernen der ersten Alkohol-fällungen, die bei mehrfachem Lösen in Wasser und Ausfällen mit Alkohol erhalten wurden, von anhaftendem Ammonoxalat völlig zu befreien, misslang, wie die nachfolgenden Analysen zeigen.

Eine nicht zu verdünnte Lösung von Ammonoxalat wird schon durch wenig Alkohol gefällt (das Gleiche bis doppelte Volumen). Die Lösung des Zuckers konnte so weit von Ammoniumoxalat befreit werden, dass eine sehr concentrirte Lösung erst durch das 10—20fache Volumen Alkohol gefällt wurde.

Wir erhielten so ein Präparat, welches rein krystallinisch war und sich durch Waschen mit Alkohol und Aether und Trocknen auf Thonplatte leicht als feines leicht gelbliches Krystallpulver gewinnen liess. Auf dieses Pulver beziehen sich die nachfolgenden Angaben.

1. Reduktionsvermögen. 0,0477 g Galactosaminoxalat reducirten 6,4 ccm. Fehling'scher Lösung, entsprechend 0,032 g Traubenzucker.

0,0477 g Galactosaminoxalat ( $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ ) wären äquimolekular mit 0,032 g Traubenzucker.

0,0477 g Galactosaminoxalat ( $(\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_5)_2 \cdot \text{C}_2\text{O}_4\text{H}_2$ ) wären äquimolekular mit 0,0383 g Traubenzucker.

ist das Reductionsvermögen also etwas grösser wie das des Traubenzuckers.

## 2. Elementare Zusammensetzung.

	Gefunden			Berechnet für		
	I	II	Mittel	$C_6H_{13}NO_5 \cdot C_2O_4H_2$	$C_6H_4(III)_2$	$(C_6H_{13}NO_5)_2 \cdot C_2O_4H_2$
C	33,19	33,02	33,11	35,68	16,90	37,50
H	6,0	6,13	6,06	5,57	7,0	6,25
N	9,7	9,74	9,72	5,20	19,72	6,25

Die gefundenen Werthe würden annähernd stimmen für 25% Ammonoxalat + 75% Galactosaminoxalat, und zwar besser für  $(C_6H_{13}NO_5)_2 \cdot C_2O_4H_2$ . Dem Isoglucosaminoxalat kommt die Formel  $C_6H_{13}NO_5 \cdot C_2O_4H_2$  zu; dem Akrosaminoxalat die Formel  $(C_6H_{13}NO_5)_2 \cdot C_2O_4H_2$ .

3. Optische Activität. Die Substanz war optisch inactiv (eine 10%ige Lösung zeigte keine mit einem Saccharimeter nachweisbare Drehung). Die Salze des Isoglycosamins sind stark linksdrehend; das Oxalat des Akrosamins ist optisch inactiv.

4. Bei Oxydation mit Salpetersäure bildet sich Schleimsäure, die durch die typischen, in kaltem Wasser sehr schwer löslichen Krystalle nachgewiesen werden konnte.

5. Die wässerige Lösung färbt sich beim Erwärmen mit Natronlauge erst gelb, dann braun (unter  $NH_3$ -Entwicklung). Beim Ansäuern trat intensiver Geruch nach Karamel auf. Auch beim einfachen Veraschen der Substanz machte sich dieser Geruch bemerkbar.

6. Mit Phenylhydrazin wird sehr leicht Osazon regenerirt. Schon in der Kälte wird nach einigem Stehen (24 Stunden) einer Zuckerlösung mit Essigsäure und Phenylhydrazin in reichlicher Menge Osazon abgeschieden. Nach kurzem Kochen tritt Osazon reichlicher auf. Schmelzpunkt nach einmaligem Umkrystallisiren  $163^\circ C$ . Ein weiteres Reinigen musste aus Mangel an Material unterbleiben.

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass bei der Reduction des Galactosazons ein Galactosamin entsteht, welches mit Oxalsäure ein aus wässriger Lösung durch Alkohol fällbares Oxalat bildet.

Die Ausbeute war sehr schlecht; aus 150 g Galactosazon erhielten wir nur 2,5 g analysenfähiges Galactosamin (noch mit Ammonoxalat verunreinigt, s. oben). Die verschiedenen durch Alkohol unvollständig gefällten Mutterlaugen lieferten beim Verdunsten noch mehrere Gramm (ca. 3 g) einer Fehling'sche Lösung sehr intensiv reducirenden Masse. Dieselbe war stark hygroscopisch, wurde an der Luft sofort syrupös und liess sich nicht in analysenfähige Form bringen.

Die Menge des als leichter durch Alkohol fällbar, durch Fractioniren abgetrennten Ammonoxalats betrug 1,2 g; dasselbe war nahezu rein.

Berechnet für  $C_2O_4(NH_4)_2 + H_2O = C 16,90, H 7,0, N 19,72, O 36,3,$

Gefunden C 16,59, H 6,84, N 20,5, O 56,07.

Zum Vergleich mit dem früher aus dem Froschglycoproteid dargestellten Zucker wurde 1 g des möglichst gereinigten Galactosaminoxalates mit 5 ccm. Wasser gelöst, sodann mit 5 ccm. 10%iger HCl und einem grossen Ueberschuss von Alkohol versetzt. Auch durch 20–30fache Menge Alkohol trat keine Fällung ein; erst durch Zusatz von reichlichen Mengen Aether konnte eine solche erzielt werden. Die aus Krystallen bestehende ausgeschiedene Masse war so hygroscopisch, dass sie nur in Form eines zähen Syrups erhalten werden konnte, in welchen sie an der Luft sofort zerfloss. Der Syrup enthielt reichlich Chlor, reducirte Fehling'sche Lösung intensiv. Beim Behandeln mit absolutem Alkohol ging ein Theil der reducirenden Substanz in Lösung, ein Theil blieb ungelöst. Von diesem ungelösten Theil wurde, nachdem derselbe durch Stehen an der Luft wieder Wasser angezogen, von Neuem ein Theil durch Alkohol gelöst, so dass nach und nach fast die ganze Substanz in eine starke Alkohollösung übergeführt werden konnte.

Wir haben also ganz ähnliche Verhältnisse vor uns, wie sie seinerzeit bei dem aus dem Glycoproteid des Frosches gewonnenen Zucker zur Beobachtung kamen. Damals wurde

vorgehoben. Wahrscheinlich ist diese Angabe dahin zu modifizieren, dass nur unreine, hygroskopische Präparate eine derartige Alkohollöslichkeit besitzen. Ob es gelingen wird, krystallinische Präparate des salzsauern Galactosamins zu gewinnen, und ob diese in Alkohol unlöslich sind, mag die Zukunft lehren; auf jeden Fall ist das Verhalten des salzsauren Glycosamins gegenüber Alkohol in typischer Weise verschieden von dem des Galactosaminchlorids.

Unsere jetzigen Erfahrungen sind dazu geeignet, die früher ausgesprochene Vermutung, dass ein Galactosamin ein Paarling des Glycoproteids der Froscheiweissdrüse sei, wesentlich zu unterstützen.

Die nächsten Aufgaben werden sein, erstens aus dem Galactosazon wirklich reines Galactosamin darzustellen. Zweitens ist zu versuchen, ob der aus den untersuchten Glycoproteiden abspaltbare Zucker in Gestalt des Oxalats, die für die Abscheidung offenbar die günstigsten Bedingungen darbietet, in reiner Form zu gewinnen ist.

---

# **Untersuchungen über die Gallen einiger Polarthiere.**

Von

**Olof Hammarsten.**

---

(Der Redaction zugegangen am 12. April 1901.)

---

## **I. Ueber die Galle des Eisbären.**

### **I. Abschnitt.**

Durch die beiden schwedischen Expeditionen mit «Antarctic» in den Jahren 1898 und 1899, wie auch durch die zwei Expeditionen nach Grönland im Jahre 1900 — die schwedische unter Kolthoff und die dänische unter Amdrup —, habe ich Gallen von Eisbären, Moschusochsen, Wallross und ein paar Arten von Seehunden zur Untersuchung erhalten. Ich benutze diese Gelegenheit, um dem Herrn Professor G. Nathorst in Stockholm, den Herren Conservator Kolthoff und Docent Nordenskiöld in Upsala und dem Herrn Cand. Mag. N. Hartz in Kopenhagen meinen verbindlichsten Dank für das Aufsammeln des Untersuchungsmateriales öffentlich auszusprechen.

Wie zu erwarten, bin ich bei dieser Arbeit mehrmals auf recht auffällige und eigenthümliche Abweichungen von dem Verhalten der bisher untersuchten Gallen gestossen, die vergleichende Untersuchungen auch anderer Gallen von neuen Gesichtspunkten aus sehr wünschenswerth machten. Aus diesem Grunde habe ich auch die Rinder- und Menschengalle in den Kreis meiner Untersuchungen hineinziehen müssen, und hierdurch ist die ganze Arbeit eine mehr umfassende geworden, als ich ursprünglich gedacht hatte. Ich hoffe indessen, im Laufe von einigen Jahren in einer Reihe von Aufsätzen meine



veröffentlichen zu können und ich will mit der Galle des Eisbären den Anfang machen.

Bevor ich zu meinen Untersuchungen über diese Galle übergehe, will ich jedoch erst einige allgemeine Bemerkungen über das Aufsammeln der Gallen, welches bei allen obengenannten Polarthieren in derselben Weise geschah, vorausschicken. Die Galle wurde immer, so bald als möglich nach dem Tödtten des Thieres, direkt aus der Blase in eine grosse, mit Alkohol von 96% beschickte Glasflasche hineingegossen. Die Menge des Alkohols in der Flasche war so gross, dass nach dem vollständigen Ausfüllen der letzteren mit Galle von einer bestimmten Thierart auf je 1 Volumen Galle 4—5 Volumina Alkohol kommen würden. Da aber in den allermeisten Fällen die Flaschen nicht mit Galle gefüllt werden konnten, kamen meistens auf je 1 Volumen Galle bedeutend grössere Mengen Alkohol. Durch den Alkohol konnte die Fäulniss der Gallen vollständig verhindert werden, und sie waren also für die qualitative Untersuchung völlig brauchbar. In Folge der Ausfällung des sogenannten Gallenschleimes und auch eines Theiles der Mineralstoffe konnte dagegen eine vollständige quantitative Analyse nicht ausgeführt werden. Dagegen war die quantitative Analyse der alkohollöslichen Stoffe noch möglich. Ich erhielt die Gallen zur Verarbeitung meistens nach etwa 2—3 Monate langem Aufbewahren in Alkohol.

---

Das Gemenge von Eisbärengalle und Alkohol stellte eine sehr dunkelbraun gefärbte Lösung mit einem reichlichen Bodensatz dar. Der letztere wurde abfiltrirt und mit Alkohol ausgewaschen. Von dem mit dem Waschalkohol gemischten alkoholischen Filtrate<sup>1)</sup> wurde ein kleiner Theil zur Untersuchung der Farbstoffe reservirt und der Rest auf dem Wasser-

---

<sup>1)</sup> Es handelt sich hier um die Hauptmenge der zur Untersuchung erhaltenen Eisbärengalle (Nathorst-Expedition 1899). Die in den Jahren 1898 und 1900 erhaltenen Mengen waren so klein, dass sie eigentlich nur für einige Kontrollversuche hinreichend waren.

bade auf etwa die Hälfte des ursprünglichen Volumens concentrirt. Es wurden nun etwa 500 ccm. der alkoholischen Lösung, behufs etwaiger Kontrolluntersuchungen und quantitativer Bestimmungen, in einer gut verkorkten Flasche aufbewahrt, während der Rest der Lösung (etwas mehr als 2,5 l.) im Wasserbade bis zur Trockne verdunstet wurde. Die hierbei zurückbleibende Masse, die erst, nachdem sie einige Zeit im Exsiccator gestanden hatte, pulverisirbar war und die an der Luft rasch unter Wasseraufnahme wieder zähe wurde, löste ich in Alkohol, filtrirte von dem Ungelösten ab und verdunstete wiederum zur Trockne. Ueber die weitere Verarbeitung dieser Masse siehe unten.

In dem ursprünglichen, nicht auf dem Wasserbade concentrirten alkoholischen Filtrate konnten drei Farbstoffe direkt nachgewiesen werden. 1. Bilirubin, welches indessen nur in sehr geringer Menge vorhanden war. 2. Urobilin oder Stercobilin, welches mit Ammoniak und Chlorzink eine grün fluorescirende Lösung und den charakteristischen Streifen des Stercobilins gab. Die Menge des Bilirubins war so klein, dass die Veränderung dieses Farbstoffes durch Ammoniak und Chlorzink den direkten Nachweis des Stercobilins in der Lösung nicht im Geringsten hinderte. 3. Ein braungelber Farbstoff, den ich auch in Gallensteinen vom Eisbären gefunden habe. Dieser Farbstoff gibt nicht die Gmelin'sche Reaction. Er zeigt keinen Absorptionsstreifen im Spectrum, sei es bei direkter Untersuchung oder nach Zusatz von Ammoniak und Chlorzink, wodurch ebenfalls keine Fluorescenz hervorgerufen wird. Diesem Farbstoffe gegenüber, welcher den hauptsächlichsten Farbstoff der Gallenlösung darstellte, kamen sowohl das Bilirubin wie das Stercobilin in nur geringen Mengen vor. Dies gilt sowohl von den im Jahre 1898, wie von den in den Jahren 1899 und 1900 erhaltenen Eisbärengallen.

Ob dieser Farbstoff schon in der frisch gelassenen Galle sich vorfindet oder erst während der Aufbewahrung in der alkoholischen Lösung aus einem anderen Farbstoffe entstanden ist, lasse ich dahingestellt sein. Der Umstand, dass ich denselben Farbstoff auch in den Gallensteinen von zwei Eisbären



beweis für dieselbe verwerthen. Da ich den Farbstoff nicht ohne Aufopferung einer grösseren Menge des seltenen *Materialies* hätte näher studiren können, und da es zudem fraglich war, ob hier ein präformirtes Pigment vorlag, habe ich von der weiteren Untersuchung desselben Abstand genommen.

Wie oben bemerkt, hatte ich die Hauptmasse der Galle zweimal im Wasserbade zur Trockne gebracht, was ich, auf Grund der an anderen Gallen bisher gemachten Erfahrungen, glaubte ungestraft machen zu können. Zu meinem Bedauern fand ich indessen im Laufe der Arbeit, aber leider etwas zu spät, dass das Eintrocknen im Wasserbade für die Eisbären-galle (und wie es scheint auch für andere Gallen, wie die Menschengalle) kaum ganz zulässig sein dürfte. Aus dem Grunde wurde die Hauptmenge der Galle hauptsächlich zu dem Studium der gallensauren Salze und deren Spaltungsprodukte verwendet. Ueber die Resultate dieser Untersuchungen soll in dem zweiten Abschnitte dieser Abhandlung berichtet werden. In diesem Abschnitte werde ich einige mehr orientirende systematische Untersuchungen mittheilen, zu welchen hauptsächlich die obengenannte, nur bis auf die Hälfte concentrirte Lösung (500 ccm.) benutzt wurde. Glücklicher Weise konnte ich auch die Richtigkeit einiger an der grossen Hauptmasse gemachten Beobachtungen durch die im Jahre 1900 durch die Amdrup'sche Expedition erhaltene Galle constatiren. Diese Galle wurde nämlich immer bei einer Temperatur, die nie mehr als 40—45° C. betrug, concentrirt; und sie wurde darauf in Vacuo bei Zimmertemperatur getrocknet.

In dem obengenannten, bis auf etwa die Hälfte concentrirten, für Kontrolluntersuchungen reservirten Filtrate (etwa 500 ccm.) wurde in kleineren Proben von 5 bzw. 10 ccm. der Gehalt an festen Stoffen genau bestimmt. Er betrug 3,37 %.

Bei dem Eintrocknen eines Theiles dieser Lösung, erst auf dem Wasserbade und dann im Exsiccator, blieb beim Behandeln des Rückstandes mit absolutem Alkohol ein braun-gefärbter Rest zurück, der, nach sehr genauem Auswaschen

mit absolutem Alkohol, in Wasser gelöst wurde. Er löste sich hierbei ganz klar und vollständig zu einer gelbgefärbten Lösung auf. Nach dem Eintrocknen der letzteren und Einäschern des Rückstandes schien mir die Reaction auf Schwefelsäure in der Asche auffallend stark zu sein.

Dies veranlasste mich, einen quantitativen Versuch zu machen; und da dieser Versuch gleichzeitig auch zu anderen Zwecken dienen sollte, wurden von der obengenannten alkoholischen Gallenlösung (mit 3,37 % festen Stoffen) 2 Portionen auf je 75 ccm. (a) und 50 ccm. (b) in Platinschalen vorsichtig concentrirt und eingetrocknet. Der in jeder Portion erhaltene Rückstand wurde gesondert mit absolutem Alkohol behandelt und das Ungelöste, nach sorgfältigem Auswaschen mit absolutem Alkohol, in Wasser gelöst. Die filtrirte Lösung wurde eingetrocknet und der Rückstand gewogen. Er wog in a 0,0925 und in b 0,0615 g. Auf die Trockensubstanz (in a 2,5275 und in b 1,685 g) umgerechnet, betrug er also 3,66 bzw. 3,65 %. Es wurde nun über der Spiritusflamme eingeäschert und die Aschen gewogen. Die Gesamttasche der beiden Proben betrug 0,040 g und der in Alkohol unlösliche Rückstand bestand also aus rund 75 % organischer und 25 % anorganischer Substanz. Von den Aschebestandtheilen waren 0,0305 g in Wasser löslich und 0,0095 g in Wasser unlöslich. Die unlöslichen enthielten Kalk, Phosphorsäure und Eisen. In den löslichen wurden nur das Chlor (durch Titration mit  $\frac{n}{10}$  AgNO<sub>3</sub>-Lösung) und die Schwefelsäure (als Baryumsulfat) bestimmt. Berechnet man das Chlor und die Schwefelsäure als Natriumverbindungen, so wurden erhalten: 0,00117 g NaCl und 0,02073 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die übrigen löslichen Salze kamen wahrscheinlich als Phosphate und Carbonate vor. Die Asche reagirte alkalisch.

Die Asche enthielt also nur verschwindend kleine Mengen Chloralkalien und der Hauptbestandtheil war jedenfalls Sulfat. Als Natriumsalz berechnet, betrug die Menge des Sulfates 51,82 % von der Gesamttasche und 67,96 % der löslichen Salze. Da es hier um eine alkoholische Gallenlösung sich handelte, die

gäben Vorstellungen gemäss, sehr arm an Sulfaten sein soll, muss ich als eine auffallende Eigenschaft der Eisbärengalle den unerwartet hohen Gehalt der in absolutem Alkohol unlöslichen Stoffe an Schwefel bezeichnen.

Man könnte vielleicht meinen, es rühre dies daher, dass die Eisbärengalle, abweichend von anderen Gallen, verhältnissmässig reich an Sulfaten sei; durch eine solche Annahme kann aber die obige Beobachtung nicht erklärt werden. Wird das von dem in absolutem Alkohol Ungelösten getrennte Filtrat wiederum eingetrocknet, so erhält man einen neuen ungelösten Rückstand, der ebenfalls reich an Schwefel ist, und wenn man das Eintrocknen und Wiederauflösen in Alkohol mehrmals wiederholt, erhält man jedesmal einen ungelösten, schwefelhaltigen Rest.<sup>1)</sup> Da die Sulfate in absolutem Alkohol unlöslich sind, ist also die obige Annahme unhaltbar. Es handelt sich, was auch später bewiesen werden soll, unzweifelhaft um eine organische, schwefelhaltige Substanz. Aehnliche Erfahrungen hatte ich übrigens schon früher bei meinen Untersuchungen über die Menschengalle gemacht. Auch hier erhielt ich bei wiederholtem Eintrocknen der alkoholischen Gallenlösung auf dem Wasserbade und Wiederauflösen in Alkohol unlösliche Rückstände, die indessen nicht auf einen Gehalt an Schwefel geprüft wurden. Bei einer neulich ausgeführten Untersuchung der Blasengalle eines Hingerichteten habe ich dasselbe Verhalten wiederum gefunden. Die Asche der in absolutem Alkohol unlöslichen organischen Substanz bestand in diesem Falle zum allergrössten Theil aus Sulfat.

Es schien mir von Interesse zu sein, die Eigenschaften der unbekannten, schwefelhaltigen Substanz der Eisbärengalle noch weiter zu erforschen. Zuerst versuchte ich aber, wenn möglich, Aufschluss über die ungefähre Menge derselben zu gewinnen.

---

<sup>1)</sup> Um Wiederholungen zu vermeiden, bemerke ich hier ein für alle Mal, dass bei der Prüfung auf Schwefel wie auch bei der quantitativen Bestimmung desselben nicht die Gas-, sondern die Spiritusflamme benutzt wurde.

Zu dem Ende stellte ich einen neuen Versuch mit 50 ccm. der obenerwähnten alkoholischen Gallenlösung (mit 3,37% festen Stoffen) an. Die abgemessene Menge wurde in einer hinreichend geräumigen Platinschale auf dem Wasserbade sehr vorsichtig verdunstet und dann auf dem siedenden Wasserbade mehrere Stunden getrocknet. Nach 24 stündigem Stehen im Exsiccator wurde in absolutem Alkohol gelöst, wobei ein ungelöster Rest zurückblieb. Dieser Rest wurde nach ein paar Tagen von der Lösung getrennt, auf einem sehr kleinen Filtrum gesammelt und mit viel absolutem Alkohol genau ausgewaschen. Darauf wurde er in Wasser gelöst, die Lösung filtrirt, in einer Platinschale bis zu constantem Gewicht (was sehr leicht auf dem Wasserbade gelang) eingetrocknet und gewogen. Das alkoholische Filtrat, sammt dem Waschkalkohol, wurde von Neuem wie oben eingetrocknet und der Rückstand mit absolutem Alkohol behandelt. Der hierbei ungelöst zurückbleibende Rest wurde nach dem Auswaschen mit Alkohol und Auflösen in Wasser in dieselbe Platinschale, wie der vorige Rest, übergeführt, getrocknet und gewogen. In dieser Weise wurden sämtliche von einer Anzahl Eintrocknungen herührende Rückstände in derselben Schale eingetrocknet, gewogen und zuletzt, behufs der Schwefelsäurebestimmung, eingäschert.

In diesem Versuche wurde in dieser Weise insgesamt 24 Mal eingetrocknet und wieder in Alkohol gelöst, ohne dass ich trotzdem zu Ende gekommen bin. Der Versuch nahm mehrere Monate in Anspruch, und da er, damit keine Verluste stattfänden, mit peinlicher Genauigkeit ausgeführt werden musste, habe ich nur diesen einzigen quantitativen Versuch ausgeführt.

Der Versuch zerfällt in 4 Perioden, und in jeder der drei ersten kamen je 7, in der vierten dagegen nur 3 Eintrocknungen und Wiederauflösungen vor.

Die Gesamtmenge der festen Stoffe in den angewendeten 50 ccm. Gallenlösung war 1,685 g. Nach dem ersten Eintrocknen betrug das Gewicht des in Alkohol unlöslichen Rückstandes 0,0605 g, nach dem zweiten betrug es 0,0065 g und

0,003 g. Im Ganzen wurden in der ersten Periode 0,089 g in Alkohol unlöslichen Rückstandes erhalten.

Bei dem Einäschern lieferten diese 0,089 g genau 0,020 g Asche, und die Menge der organischen Substanz war also 0,069 g. Der Rückstand enthielt also 77,5% organische Substanz und 22,5% Asche. Die letztere lieferte 0,017 g  $\text{BaSO}_4$ , was 0,01037 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  entspricht. Von der Asche bestanden also 51,85% aus  $\text{NaSO}_4$ , wenn man auch hier den Schwefel in dieser Form berechnet.

In der zweiten Periode wurden nach siebenmaligem Eintrocknen und Auflösen insgesamt 0,0435 g in Alkohol unlöslichen Rückstandes erhalten. Dieser Rückstand war nach dem Trocknen, wie in der vorigen Periode, tiefbraun. Das Einäschern lieferte 0,011 g Asche, aus der 0,009 g  $\text{BaSO}_4 = 0,00549 \text{ Na}_2\text{SO}_4$  erhalten wurden. Der Gehalt der Asche an  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  war also rund 50% (genauer 49,9%).

Schon aus dem nun Mitgetheilten dürfte man wohl ohne Weiteres den Schluss ziehen können, dass der Schwefelgehalt des in Alkohol unlöslichen Rückstandes nicht von präformirten Sulfaten herrühren kann. Viel näher liegt die Annahme, dass es hier um die Zersetzung einer schwefelhaltigen Substanz, etwa einer Aetherschwefelsäure, sich handele; eine solche Annahme reicht jedoch nicht zur Erklärung aus. Ich habe nämlich die Eisbären-galle in derselben Weise wie früher die Haifischgalle und die Menschengalle durch andauerndes Erhitzen mit Salzsäure auf Aetherschwefelsäure geprüft. Die Mengen der hierbei erhaltenen Schwefelsäure waren aber so klein, dass sie nicht genau bestimmt werden konnten.

Durch die Gegenwart einer Aetherschwefelsäure lassen sich also die obigen Beobachtungen jedenfalls nicht erklären. Dagegen könnte man vielleicht sich vorstellen, dass bei dem Eintrocknen eine Zersetzung einer Taurocholsäure, unter Abspaltung von dem in Alkohol unlöslichen Taurin, stattgefunden hätte, und dass der Schwefelgehalt des alkoholunlöslichen Rückstandes in dieser Weise zu erklären sei. Zur Prüfung dieser Möglichkeit diene die dritte Periode desselben Versuches. In

dieser Periode wurde 7 Mal eingetrocknet und in Alkohol wieder gelöst.

Das Gesamtgewicht der unlöslichen Rückstände betrug diesmal 0,035 g. Die Rückstände wurden nicht eingäschert, sondern ich löste sie in Wasser und fällte (auf Grund anderer mittlerweile gemachten Beobachtungen) die Lösung mit Salzsäure. Hierbei erhielt ich einen lockeren, flockigen, dunkelgefärbten Niederschlag, der auf einem Filtrum gesammelt und mit salzsäurehaltigem Wasser genau ausgewaschen wurde. Der Niederschlag war in Alkohol löslich. Dieser Niederschlag, der nach dem Auswaschen weder Taurin noch Schwefelsäure enthalten konnte, liess sich nicht gut von dem Filtrum trennen. Er wurde deshalb in Alkohol gelöst; die alkoholische Lösung wurde filtrirt und eingetrocknet. Der Rückstand, mit reinem KOH und  $\text{KNO}_3$  über der Spiritusflamme verbrannt, lieferte eine Schmelze, die eine schöne Schwefelsäurereaction gab.

Hierdurch scheint also der Beweis geliefert zu sein, dass der in Alkohol unlösliche Rückstand weder Sulfat, noch Taurin enthält. Dagegen enthielt er die in Wasser lösliche Alkali-Verbindung einer mit Säure fällbaren, schwefelhaltigen Substanz.

Auf Grund anderer Beobachtungen, die ich im Laufe meiner Untersuchungen gemacht hatte, fand ich es nothwendig, den alkoholunlöslichen Rückstand auch auf einen Gehalt an Phosphor zu prüfen. Zu dem Ende machte ich in der vierten Versuchsperiode noch drei abwechselnde Eintrocknungen und Auflösungen in Alkohol. Das Gesamtgewicht der Rückstände betrug 0,011 g. In diesem Rückstande konnte in der Schmelze sowohl Schwefel als Phosphor leicht nachgewiesen werden. Da die nunmehr beim Eintrocknen erhaltenen Substanzmengen sehr klein waren, fand ich es nicht nothwendig, den Versuch fortzusetzen.

In dem nun mitgetheilten Versuche waren ursprünglich 50 ccm. alkoholischer Gallenlösung mit 1,685 g festen Stoffen in Arbeit genommen worden. Die Gesamtmenge der gewonnenen, in Alkohol unlöslichen Rückstände nach 24maligem Auflösen und Eintrocknen war 0,1775 g. Unter der Voraussetzung, dass während des Versuches keine Verluste statt-

untersuchten Rückstände gleichzeitig Schwefel und Phosphor enthielten, musste es vorläufig unentschieden bleiben, ob es hier um eine gleichzeitig schwefel- und phosphorhaltige Substanz oder nur um ein Gemenge von einer schwefelhaltigen Substanz mit Lecithin sich handelte.

Die nun erwähnten Beobachtungen, denen zufolge die in Alkohol unlöslichen Rückstände eine in Wasser lösliche Alkali-Verbindung einer schwefelhaltigen, durch Salzsäure fällbaren Substanz enthalten, forderten zu einer weiteren Prüfung auf. Zu dem Ende versuchte ich, aus der obengenannten Hauptmenge der Galle, die ich schon zweimal im Wasserbade eingetrocknet hatte, eine etwas grössere Menge der Substanz zu gewinnen. Durch dreimaliges Eintrocknen und Auflösen in Alkohol konnte ich auch eine anscheinend nicht unbedeutende Menge Rohsubstanz darstellen. Das Rohprodukt war aber fast ganz schwarz. Alle Versuche, dasselbe durch Thierkohle von dem Farbstoffe zu befreien, waren indessen erfolglos, denn es wurde hierbei die Hauptmenge der Substanz mit dem Farbstoffe von den Kohlen zurückgehalten. Auch andere Reinigungsversuche waren ohne Erfolg, und ich musste also, nachdem ich durch vergebliche Reinigungsversuche die grösste Menge der Substanz verloren hatte, die zuletzt erhaltene, noch bräunlichgelb gefärbte Lösung mit Salzsäure fällen. Der mit salzsäurehaltigem Wasser sorgfältig ausgewaschene Niederschlag wurde in Alkohol gelöst, die Lösung durch Filtration von einem schwarzgefärbten, ungelösten Rest getrennt und eingetrocknet. Die Substanz, die nach dem Eintrocknen wieder schwarzbraun gefärbt war, wurde zu einer Schwefelbestimmung verwendet.

0,171 g lieferten nach dem Schmelzen mit KOH und  $\text{KNO}_3$  0,022 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,003024 g Schwefel = 1,78 % S.<sup>1)</sup>

Die Substanz enthielt also 1,78 % Schwefel. Da sie aber

---

<sup>1)</sup> Da es mir nicht möglich gewesen ist, absolut schwefelfreie Reagentien zu erhalten, habe ich überall die entsprechende Correction für die angewandten Reagentien gemacht.



allem Anscheine nach von verändertem Gallenfarbstoff stark verunreinigt war, kann die Schwefelbestimmung nur zur Bestätigung der obigen Beobachtungen über das Vorkommen einer mit Salzsäure fällbaren, schwefelhaltigen Substanz dienen. Bei der Ausführung dieser Bestimmung war mir das Vorkommen von Phosphor in der fällbaren Substanz noch nicht bekannt, und aus dem Grunde wurde leider keine Phosphorbestimmung ausgeführt.

Die schwefelhaltige Substanz glaubte ich anfänglich als das Zersetzungsprodukt eines anderen schwefelhaltigen Stoffes betrachten zu können, finde dies aber nunmehr, wenigstens für die Hauptmasse derselben, weniger wahrscheinlich. Ich habe nämlich später gefunden, dass man dieselbe Substanz auch in anderer Weise ohne wiederholtes Auflösen und Eintrocknen gewinnen kann. Wenn man nämlich die filtrirte, völlig klare Lösung der alkohollöslichen Stoffe in Alkohol von 96% mit grossen Mengen Alkohol verdünnt, so trübt sich das Gemenge und es scheidet sich allmählich ein flockiger Niederschlag aus, der in ganz derselben Weise wie der durch Eintrocknen erhaltene Rückstand sich verhält.

In dieser Weise habe ich auch aus der Hauptmasse der Gallenlösung, nach fünfmaligem Eintrocknen, aus dem letzten Alkoholfiltrate durch Verdünnung mit mehreren Litern Alkohol noch eine Menge der fraglichen Substanz gewinnen können. Sie war diesmal weniger gefärbt, bräunlichgrau, lieferte aber zuletzt wiederum eine gelbbraun gefärbte Lösung, aus der sie wie oben mit Salzsäure gefällt wurde. Die zuletzt erhaltene getrocknete, braune Substanz wurde zur Bestimmung sowohl des Schwefels wie des Phosphors nach dem Verbrennen mit KOH und  $\text{KNO}_3$  verwendet.

Da in diesem Falle dieselbe Substanzmenge zur Bestimmung der beiden Stoffe benutzt werden musste, verfuhr ich in folgender Weise. Nach dem Abfiltriren des Baryumsulfates wurde das überschüssige Baryum mit Schwefelsäure aus dem Filtrate entfernt. Das neue Filtrat wurde unter Zusatz von Schwefelsäure einige Male, zur Entfernung der Salzsäure, eingetrocknet und darauf die Phosphorsäure erst mit Molybdänlösung und dann zuletzt als Ammonmagnesiumphosphat gefällt. Die Substanz wurde hier, wie immer für die Schwefel- und Phosphorbestimmungen, nach meinem Verfahren mit Kalihydrat und Salpeter verbrannt.



Sie lieferten ferner 0,012 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_8$ , = 0,00335 g Phosphor = 1,19 % P.

Die analysirte Substanz enthielt also 1,57 % S und 1,19 % P. Unter der Annahme, dass der Phosphor nicht der Substanz selbst angehört, sondern von einer Verunreinigung mit Lecithin herrührt, würde also, wenn man den mittleren Gehalt der Lecithine an Phosphor zu 3,94 % P berechnet, die analysirte Substanz etwa 10,78 % Lecithin enthalten haben.

Da die zu der Analyse verwendete Substanz diesmal aus dem alkoholischen Filtrate der fünfmal im Wasserbade eingetrockneten Galle stammte, kann selbstverständlich die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es auch in diesem Falle um ein Zersetzungsprodukt sich handelte. Gegen eine solche Annahme spricht indessen, dass ich eine Substanz mit denselben Eigenschaften auch aus der zuletzt erhaltenen Eisbärengalle (von der Amdrupexpedition 1900) einfach durch starkes Verdünnen der alkoholischen Lösung mit viel Alkohol habe darstellen können. Diese Galle ist nämlich nie bei höherer Temperatur als 45° C. verdunstet worden.

Mit der aus dieser neuen Galle isolirten Substanz habe ich meine früheren Beobachtungen kontrollirt und ein wenig vervollständigt.<sup>1)</sup> Dass ich auch diesmal die Substanz nicht rein erhielt, kann ich nicht bezweifeln; in der letzten Zeit glaube ich aber die Substanz in grösserer Reinheit erhalten zu haben. Es ist mir nämlich gelungen, eine schwefel- und phosphorhaltige Substanz von den obengenannten Eigenschaften aus den in Alkoholäther löslichen Stoffen der Eisbärengalle darzustellen.

Bei Verarbeitung der zuletzt erhaltenen Galle (von der Amdrupexpedition) habe ich, nach der Ausfällung der gallensauren Salze mit Aether aus der alkoholischen Lösung, das

---

<sup>1)</sup> Zu einer quantitativen Bestimmung von Schwefel und Phosphor reichte die Substanz in diesem Falle nicht aus, denn es ging wiederum bei der Reinigung der grösste Theil verloren. Dagegen konnte der qualitative Nachweis der beiden Elemente leicht und sicher geführt werden.

Der in möglichst wenig absolutem Alkohol gelöste Rückstand wurde durch Zusatz von überschüssigem Aceton wieder gefällt und die acetonlöslichen Stoffe durch Filtration entfernt. Der in Aceton unlösliche Rückstand wurde wieder in Alkohol gelöst und die filtrirte Lösung mit viel Alkohol verdünnt. Hierbei schied sich ein schwach gelblichweisser, flockiger Niederschlag aus, der abfiltrirt und mit Alkohol genau ausgewaschen wurde. Durch Auflösen in möglichst wenig Wasser und neue Ausfällung mit Alkohol wurde die Substanz gereinigt. Nach der Ausführung einiger qualitativen Reactionen, durch welche die Identität mit der früher erhaltenen Substanz bewiesen wurde, waren im Ganzen nur 0,107 g Substanz zu der Schwefel- und Phosphorbestimmung (vergl. unten) übrig.

Die Eigenschaften der in dem Vorigen besprochenen unbekannten Substanz sind folgende.

Die Substanz kommt in der Galle als eine in Wasser klar lösliche Alkaliverbindung vor. Diese Alkaliverbindung ist löslich in Alkohol, selbst in absolutem, kann aber durch Verdünnung der Lösung mit viel Alkohol zum Theil ausgefällt werden. Lässt man die Verbindung einige Zeit unter Alkohol ausgefällt stehen, so löst sie sich nicht klar und bisweilen nicht wieder vollständig in Wasser auf. Ebenso löst sie sich nach der Ausfällung mit Alkohol nie vollständig wieder in starkem Alkohol auf. Nach dem Eintrocknen der alkoholischen Lösung bleibt, wie aus dem Obigen hervorgeht, jedesmal ein Theil als in Alkohol unlöslich zurück. Die concentrirte Lösung der Alkaliverbindung in Wasser kann mit Alkohol gefällt werden; die Ausfällung ist aber sehr unvollständig und mit grossen Verlusten verknüpft. Die Lösung in Wasser wird ferner von einigen Metallsalzen, wie Kupfersulfat, neutralem Bleiacetat und Zinkchlorid gefällt. Die Lösung der Alkaliverbindung in Alkohol wird nicht von Platinchlorid, wohl aber von Cadmiumchlorid gefällt. Der Cadmiumniederschlag enthält sowohl Schwefel als Phosphor.

Die freie Substanz erhält man als einen amorphen

der Alkanverbindung mit einer Säure. Der durch Salzsäure erzeugte Niederschlag ist kurze Zeit nach der Ausfällung löslich in Wasser, aber schwer löslich in verdünnter Salzsäure. Lässt man den Niederschlag einige Zeit (etwa 24 Stunden) in der sauren Flüssigkeit verbleiben, so wird er schwerlöslicher und nur unvollständig löslich in Wasser. Ähnliches gilt auch von der Löslichkeit der freien Substanz in Alkohol: bald nach dem Ausfällen ist er leichtlöslich, wird aber allmählich schwerlöslicher und zum Theil in Alkohol, wenigstens in kaltem, unlöslich. In Aether ist die Substanz immer schwerlöslicher als in Alkohol. In Chloroform oder Benzol ist sie leicht und vollständig löslich.

Die Substanz reducirt Kupferoxyd in alkalischer Lösung. Bei Verwendung von unreiner Substanz ist die Ausscheidung von Kupferoxydul geringfügig und schwer zu beobachten, während man in der Lösung die Gegenwart von reichlichen Mengen Kupferoxydul leicht nachweisen kann. Bei Prüfung der reinen Substanz findet dagegen eine schöne Ausscheidung von Kupferoxydul statt. Die Substanz gibt nicht die Pettenkofer'sche Gallensäurereaction.

Die Analyse des zuletzt erhaltenen, gelblichweissen und reinsten Präparates gab folgende Resultate:

0,107 g Substanz (bei 102° C. getrocknet) lieferten 0,011 g  $\text{BaSO}_4$   
= 0,0015119 g Schwefel = 1,41 % S.

Bei der Phosphorbestimmung wurden erhalten 0,004 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$   
= 0,00117 g Phosphor = 1,044 % P.

Die Substanz enthielt also 1,41 % S und 1,04 % P. Der Gehalt an Phosphor legt die Vermuthung nahe, dass es hier entweder um eine mit Lecithin verunreinigte, schwefelhaltige Substanz oder um einen der Jecorin- oder Protagongruppe angehörigen Stoff sich handelt.

In Anbetracht der Fähigkeit des Lecithins, die Löslichkeitsverhältnisse anderer Stoffe wesentlich zu verändern,<sup>1)</sup> könnte man vielleicht sich vorstellen, dass die fragliche Substanz ein alkohollösliches Gemenge von Lecithin und Alkali-

---

1) Vergl. H. J. Bing, Skand. Arch. f. Physiol., Bd. XI, S. 166.

sulfat sei. Abgesehen von anderen Verhältnissen sprechen jedoch entschieden gegen eine solche Annahme: 1. der Schwefelgehalt der mit Säure gefällten, genau angewaschenen freien Substanz und 2. der Schwefelgehalt der Cadmiumverbindung. Dass die Substanz ihren Schwefelgehalt nicht einer Beimengung von Taurin zu verdanken hat, folgt ebenfalls aus dem Schwefelgehalte der mit Säure gefällten, ausgewaschenen Substanz, abgesehen davon, dass die zuletzt geübte Darstellungsmethode die Zersetzung eines Taurocholates ausschliesst. Dass der Schwefelgehalt endlich nicht durch Beimengung von taurocholsaurem Salz zu erklären sei, geht daraus hervor, dass die Alkaliverbindung durch Waschen mit Alkohol leicht frei von gallensauren Salzen erhalten wird und dass sie die Pettenkofer'sche Reaction nicht gibt. Selbst eine verschwindend kleine, absichtliche Verunreinigung mit Gallensalz gibt sich durch die Pettenkofer'sche Reaction und durch den bitteren Geschmack deutlich kund. Die Möglichkeit, dass hier ein Gemenge von Lecithin mit einer unbekannten, reducirenden, schwefelhaltigen Substanz oder von Lecithin, Zucker und einem schwefelhaltigen Körper vorliegt, kann ich dagegen selbstverständlich nicht zurückweisen.

Die Reductionsfähigkeit der Substanz wie auch ihr Schwefel- und Phosphorgehalt lassen sich jedoch sehr gut mit der Annahme vereinbaren, dass der fragliche Stoff dem Jecorin oder den Protagonsubstanzen verwandt sei. Das Jecorin soll allerdings nach Bing ein Lecithinzucker sein, was indessen nicht den von Drechsel gefundenen Schwefelgehalt desselben erklärt. Der Schwefelgehalt der Gallensubstanz steht auch der Annahme von einer Verwandtschaft derselben zu den Protagonen nicht im Wege, denn es haben Kossel und Freytag<sup>1)</sup> in dem Protagon regelmässig einen Gehalt an Schwefel gefunden. Unsere Kenntniss von dem Jecorin und den Protagonen ist übrigens noch so mangelhaft, dass es schwierig ist, einen Vergleich zwischen ihnen und anderen Substanzen zu machen.

---

<sup>1)</sup> Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, S. 481.

sprochenen, schwefelhaltigen Bestandtheile der Galle des Eisbären zum Abschluss zu bringen. Ich bin aber der Ansicht, dass die fragliche Substanz entweder dem Jecorin (bezw. den Protagonen) verwandt sei, oder aus einem Gemenge von Lecithin mit einem unbekannten, schwefelhaltigen Stoffe bestehe.

Das Wesentlichste ist jedenfalls, dass in der Eisbären-galle ausser den Gallensäuren eine andere, schwefelhaltige Substanz vorkommt, und ich kann nicht umhin, auf die Wichtigkeit dieses Verhaltens hier die Aufmerksamkeit zu lenken. Man hat bisher allgemein den Gehalt der verschiedenen Gallen an Glykochol- und Taurocholsäure aus dem Schwefelgehalte berechnet. Dass dies nicht richtig ist, habe ich schon durch meine Untersuchungen über die Haifischgalle gezeigt, indem nämlich diese, sehr schwefelreiche Galle überhaupt keine Taurocholsäure, sondern nur Aetherschwefelsäuren enthält. Auch in der Menschengalle können, wie ich gezeigt habe, Aetherschwefelsäuren vorhanden sein. In der Rindergalle bin ich ebenfalls auf eine unbekannte, wie es scheint, schwefel- und phosphorhaltige Substanz gestossen, und es fordert dies dringend zu einer mehr eingehenden Prüfung der schwefelhaltigen und gewiss auch der phosphorhaltigen Bestandtheile der Galle auf.

Ich gehe nun zu einem anderen, auffallenden Verhalten der Eisbären-galle, nämlich zu dem relativen Mengenverhältnissen der durch Aether fällbaren und nicht fällbaren Stoffe über.

Zur Bestimmung der durch Aether fällbaren gallensauren Salze und Seifen dienen die oben (S. 439) genannten Filtrate a und b von dem alkoholunlöslichen Rückstande. Jedes Filtrat wurde gesondert bis auf ein kleines Volumen concentrirt und mit überschüssigem Aether gefällt. Der Niederschlag, welcher bei raschem Zusatz des Aethers, unter Umschwenken, feinkörnig und nicht harzig erhalten werden kann, wurde auf einem Filtrum gesammelt und mit Aether gewaschen. Darauf wurde er in absolutem Alkohol gelöst, das Filtrum mit Alkohol vollständig ausgekocht, der filtrirte alkoholische Auszug mit der Lösung vereinigt, in einem Kolben eingetrocknet, wieder

in Alkohol gelöst, mit Aether gefällt und damit auf dem Filtrum ausgewaschen (gallensaure Alkalien 1). Sämmtliche alkohol-ätherhaltige Filtrate wurden vereinigt, durch Stehen an der Luft in einer hinreichend grossen Porcellanschale von dem Aether möglichst befreit, dann auf dem Wasserbade vorsichtig concentrirt, in einen Glaskolben übergeführt und zur Trockne verdunstet. Der Rückstand, in möglichst wenig absolutem Alkohol gelöst, wurde mit Aether versetzt; aber selbst nach Zusatz von 20 Volumina absolutem Aether trat nur eine unbedeutende Fällung auf (gallensaure Alkalien 2), die abfiltrirt und nach dem Nachwaschen mit Aether in Alkohol gelöst wurde. Diese Lösung wurde mit der alkoholischen Lösung der gallensauren Alkalien 1 vereinigt, und diese neue Lösung sammt dem zum Auskochen der Filter benutzten Alkohol concentrirt, in eine Platinschale ohne Verluste übergeführt und sehr vorsichtig im Wasserbade eingetrocknet. Nach weiterem Trocknen im Exsiccator zu constantem Gewicht, was ohne Schwierigkeit gelang, wurde gewogen.

Die ätheralkoholische Lösung wurde, wie oben, von dem Aether befreit, nach dem Verdunsten des Aethers sehr vorsichtig im Wasserbade concentrirt, dann in eine Platinschale übergeführt, im Wasserbade zur Trockne gebracht, im Exsiccator zu constantem Gewicht getrocknet<sup>1)</sup> und gewogen (alkohol-ätherlösliche Stoffe).

Bei der Verarbeitung der Probe b ging leider bei der Verdunstung der Lösung der alkohol-ätherlöslichen Stoffe durch einen Unfall ein Theil der Lösung verloren. In dieser Probe sind also nur die gallensauren Alkalien direkt bestimmt worden, und die Menge der alkohol-ätherlöslichen Stoffe wurde als Differenz zwischen der Gesamtmenge der in Arbeit genommenen alkohollöslichen Stoffe und der gallensauren Alkalien (und Seifen) berechnet. In der Probe a dagegen wurden sowohl die alkohol-ätherlöslichen Stoffe wie die gallensauren Alkalien direkt bestimmt. Die Versuchsergebnisse waren folgende:

---

<sup>1)</sup> Das Trocknen war sehr schwer ausführbar. Die Substanz musste wiederholt abwechselnd auf dem Wasserbade getrocknet und im Exsiccator über Chlorcalcium und Schwefelsäure aufbewahrt werden.

› › nicht fällbare Stoffe	= 1,122 ›
b) Gesamtmenge der alkohollöslichen Stoffe	= 1,6235 ›
Mit Aether fällbar (gallens. Alkal. und Seifen)	= 0,854 ›
› › nicht fällbar (Differenz berechnet)	= 0,7695 ›

Es waren also in Procent von den festen Stoffen

Durch Aether fällbar	Durch Aether nicht fällbar
a) 53,12 %	46,28 %
b) 52,60 %	47,40 %

Ich habe einen ähnlichen Versuch mit der im vorigen Jahre (durch die Amdrupexpedition) erhaltenen Eisbären-galle ausgeführt. Das Versuchsergebniss war folgendes:

Gesamtmenge der alkohollöslichen Stoffe	0,614 g
Mit Aether fällbar (gallens. Alkal. und Seifen)	0,440 ›
› › nicht fällbar	0,174 ›

In diesem Falle waren also 71,63 % durch Aether fällbar und 28,37 % nicht fällbar. Es zeigt dies also, dass das relative Magenverhältniss der durch Aether fällbaren und nicht fällbaren Stoffe in der Eisbären-galle, wie in den Gallen anderer Thiere, recht bedeutend wechseln kann. Auffallend ist es jedoch, dass in den Versuchen a und b die Menge der nicht fällbaren Stoffe so gross war. Die zu diesen Versuchen benutzte Galle war nämlich die Mischgalle von einer grösseren Anzahl von Individuen, und diese Zahlen können daher als ein Ausdruck für die mittlere Zusammensetzung der Eisbären-galle betrachtet werden. Unter solchen Umständen muss ich es als etwas recht Auffallendes bezeichnen, dass die Menge der durch Aether fällbaren gallensauren Alkalien (und Seifen) nur ein wenig mehr als die Hälfte der alkohollöslichen Stoffe betrug.

Vergleicht man hiermit die Analysen von Gallen anderer Thiere, so findet man, dass das relative Mengenverhältniss der gallensauren Alkalien und der alkoholätherlöslichen Stoffe, insofern als man diese Relation aus den Analysen berechnen kann,<sup>1)</sup> ein sehr wechselndes ist, aber nur selten demjenigen

---

1) Die Berechnung ist nur eine ungefähre, denn in mehreren Analysen lässt sich die Relation nicht exact berechnen.

Handgalle in den Analysen Hoppe-Seyler's) in einem Falle 71,6% durch Aether fällbare und 28,4% nicht fällbare Stoffe, in einem anderen dagegen bezw. 91,7 und 8,3%. In der Galle des Moschusochsen fand ich in der einzigen, bisher ausgeführten Analyse 93,12% ätherfällbare und 6,88% nicht fällbare Stoffe. Für die Menschengalle lassen sich sehr wechselnde Zahlen berechnen. In den Analysen von v. Gorup-Besanez<sup>2)</sup> findet man für die Blasengallen 64,6—69,5% fällbare und 30,5—35,4% durch Aether nicht fällbare Stoffe. Die von O. Jacobsen<sup>3)</sup> untersuchte Menschengalle enthielt 94,2% ätherfällbare Substanzen, und in den von mir<sup>4)</sup> untersuchten Lebergallen war die Menge derselben 80—92%. In der letzten Zeit habe ich Gelegenheit gehabt, die Blasengalle eines Hingerichteten zu untersuchen, in der ich 56,44% ätherfällbare und 43,56% in Alkoholäther lösliche Stoffe fand. Dies ist der einzige mir bekannte Fall, in welchem die Relation zwischen fällbaren und nicht fällbaren Stoffen fast dieselbe wie in der Eisbärengalle war.

Es kann also unter Umständen auch in der Menschengalle fast die Hälfte der alkohollöslichen Stoffe in Alkoholäther löslich sein, ein Verhalten, welches in Anbetracht der an die Eisbärengalle gemachten, später zu erwähnenden Beobachtungen sehr zu weiteren Untersuchungen auffordert. Die durch Aether nicht fällbaren Stoffe der Eisbärengalle stellten nach dem Eintrocknen und längerem Stehen über Schwefelsäure im Exsiccator eine harzähnliche, spröde Masse dar, die indessen an der Luft bald wieder weich, etwas klebrig und zähe wurde. Diese Masse löste sich leicht und vollständig in Alkohol, Aether, Chloroform und Benzol auf, und allem Anscheine nach könnte sie also keine gallensauren Salze enthalten. Dass diese Voraussetzung trotzdem eine unrichtige war und dass unter den in Aether oder Chloroform löslichen Stoffen gallensaure

---

1) Physiologische Chemie, Theil 2, S. 302.

2) Lehrbuch d. physiol. Chem., 4. Aufl., S. 519.

3) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch., Bd. 6.

4) Hammarsten, Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsal (3), Tome 16.



Bei der Verarbeitung von etwas grösseren Mengen der alkoholätherlöslichen Stoffe war es, selbst nach fast einjährigem Stehen der Masse im Exsiccator, unmöglich, durch Anwendung von alkohol- und wasserfreiem Aether dieselbe in einen ätherlöslichen und ätherunlöslichen Theil zu trennen. Bei Verwendung von kleineren Mengen Substanz gelang dies dagegen; ich konnte unter diesen Verhältnissen einen in absolutem Aether löslichen Theil von einem in Aether unlöslichen Reste, welcher gallensaure Salze enthielt, trennen. Um eine Kenntniss von dem Schwefelgehalte sämmtlicher gallensaurer Salze zu gewinnen, entfernte ich also, in der oben S. 452 erwähnten Probe a aus den in Alkoholäther löslichen Stoffen den in absolutem Aether löslichen Theil und vereinigte den ätherunlöslichen Rest mit den durch Aetherzusatz ausgefallten gallensauren Alkalien aus dieser Probe zur Untersuchung.

Der Schwefel wurde wie gewöhnlich nach meinem Verfahren bestimmt. Die Untersuchung auf Aetherschwefelsäure geschah nach den von mir bei der Untersuchung der Haifischgalle benutzten Methode. Die Stickstoffbestimmungen wurden nach Kjeldahl-Willfahrt ausgeführt. Die gallensauren Salze waren bis 105° C. getrocknet worden.

a) 0,627 g lieferten 0,171 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,0235 g Schwefel = 3,748% S.

b) 0,8625 g zur Bestimmung der Aetherschwefelsäuren lieferten keine genaue bestimmbare Menge Baryumsulfat.

c) 0,3445 g zur Stickstoffbestimmung erforderten 6,5 ccm. n/10 Schwefelsäure = 2,65% N.

d) 0,309 g zur Stickstoffbestimmung erforderten 6,1 ccm. n/10 Schwefelsäure = 2,75% N.

Als Mittel für den Stickstoff berechnet sich also 2,7% N.

Es wurden also gefunden 3,75% Schwefel und 2,70% Stickstoff. Das Gemenge von gallensauren Salzen war also unerwartet arm an Schwefel in Anbetracht dessen, dass es hier um die Galle eines Fleischfressers sich handelte. Dass der niedrige Schwefelgehalt nicht daher rühren kann, dass die gallensauren Alkalien mit einer reichlicheren Menge von Seifen oder stickstofffreier Substanz überhaupt gemengt waren, geht aus der Relation zwischen Schwefel und Stickstoff hervor. Das gewöhnliche Natriumtaurocholat enthält 5,96% S und

2,71% N und die Relation S:N ist also gleich 100:46. In dem analysirten Gemenge war aber die Relation N:S = 100:72. Das Taurocholat (selbst wenn es um andere Taurocholate als die gewöhnlichen sich handeln würde, was in der That zum Theil der Fall ist) musste also allem Anscheine nach mit einer anderen, schwefelfreien, aber stickstoffhaltigen Substanz gemengt sein. Als solche Substanz musste in erster Linie das Glycholat in Betracht kommen. In der That stimmen auch die erhaltenen Zahlen sehr gut zu einem Gemenge von 63 Theilen Taurocholat und 37 Theilen Glycholat — vorausgesetzt, dass die Eisbärengalle nur die gewöhnliche Cholalsäure enthielte. Dies trifft nun allerdings, wie oben angedeutet, nicht zu, indem nämlich die Eisbärengalle, wie ich in dem zweiten Abschnitte dieses Aufsatzes zeigen werde, mehrere verschiedene Cholalsäuren enthält. Für die obige, ungefähre Berechnung dürfte dies indessen von keinem wesentlichen Belange sein. Geht man also von der Zusammensetzung der gewöhnlichen, gepaarten Gallensäuren, und folglich von dem Werthe 2,88% N für das Natriumglycholat, aus, so findet man bei einem Vergleiche der für ein solches Gemenge berechneten Zahlen mit den thatsächlich gefundenen Folgendes:

	Berechnet	Gefunden
Schwefel	3,75 %	3,75 %
Stickstoff	2,78 %	2,70 %.

Die Uebereinstimmung kann kaum eine bessere sein, und ich glaubte in der That auch zuerst, ein Gemenge von Taurocholat und Glycholat vor mir zu haben. Diese Annahme erwies sich indessen als unrichtig; und das Folgende wird zeigen, zu welchen falschen Schlüssen man kommen kann, wenn man den Gehalt der gallensauren Alkalien einer Galle an Taurocholat und Glycholat aus dem Schwefel- und Stickstoffgehalte zu berechnen versucht.

Die Annahme, dass es hier um ein Gemenge von Taurocholat und Glycholat sich handelte, suchte ich durch eine besondere Untersuchung auf Glycocoll des Näheren zu prüfen. Diese Prüfung gab aber nur negative Resultate; ich konnte gar kein Glycocoll nachweisen.

mit der Verarbeitung der Galle auf Cholsäure versucht, und zu dem Ende wurde das, von den mit Salzsäure ausgefällten Rohcholsäuren getrennte Filtrat, welches Taurin und etwa vorhandenes Glycocolle enthalten musste, zur Trockne verdunstet. Zur Trennung des Taurins und Glycocolle verfuhr ich aber nicht in der von einigen Forschern<sup>1)</sup> vorgeschriebenen Weise, welche darin besteht, dass man den eingetrockneten Rückstand, in welchem man Taurin und salzsaures Glycocolle zu suchen hat, mit Alkohol behandelt. Das salzsaure Glycocolle, welches mehreren Angaben<sup>2)</sup> zufolge in Alkohol leicht löslich sein soll, ist nach meiner Erfahrung schwer löslich in Alkohol, und man läuft also die Gefahr, dass dasselbe bei der Alkoholbehandlung des Rückstandes zum grössten Theil neben dem Taurin ungelöst zurückbleibt. Dagegen kann man sehr leicht mit Alkohol das Taurin von dem salzsauren Glycocolle trennen, wenn man das Gemenge in Salzsäure von 5% HCl löst und mit dem 10fachen Volumen Alkohol von 95 Vol. Proc. versetzt. Es scheidet sich hierbei die Hauptmasse des Taurins, zwischen 80 und 90% desselben aus, selbst wenn man von einer verdünnten Taurinlösung ausgeht, während eine 7—9%ige Lösung von Glycocolle in 5%iger Salzsäure von dem 10fachen Volumen Alkohol selbst nach mehreren Tagen nicht im geringsten gefällt wird. Löst man das ausgefällte Taurin noch einmal in Salzsäure und fällt mit Alkohol, so kann man jedenfalls ganz sicher sein, alles Glycocolle in dem alkoholischen Filtrate zu haben.

Nach dem Entfernen der Hauptmasse des Taurins ver-

---

1) Hoppe-Seyler, Physiologisch. und patholog. chem. Analyse, 6. Aufl., S. 136. R. Neumeister, Lehrbuch d. physiol. Chemie, 2. Aufl., S. 209. Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie, 4. Aufl., S. 234. Die in diesen Lehrbüchern angegebene Methode ist nicht zu empfehlen.

2) Die Angaben über die Löslichkeit des salzsauren Glycocolle in Alkohol divergiren etwas. Nach den 3 obengenannten Verfassern ist die Verbindung leicht löslich in Alkohol; nach Gamgee, Die physiol. Chemie der Verdauung (von Asher und Beyer), ist sie darin wenig löslich, und dieselbe Angabe findet man bei Beilstein, Handb. d. org. Chemie, 2. Aufl. Hiermit stimmen meine neueren Erfahrungen. Das von mir benutzte Glycocolle stammte von E. Merck her.

dunstete ich die alkoholischen Filtrate zur Trockne, löste in Wasser, entfernte unlösliche amorphe braune Stoffe durch Filtration und verwendete das Filtrat zur Benzoylirung und zum Nachweis der Hippursäure nach Gonnermann.<sup>1)</sup> — Ich erhielt keine Spur von Hippursäure und überhaupt keinen in Benzol schwerlöslichen Rückstand. Ich erhielt nur in Benzol lösliche Benzoessäure. Zu diesen Untersuchungen wurden benutzt das eine Mal etwa 50 g eingetrocknete Rohgalle, entsprechend etwa 26 g gallensauren Salzen und das andere Mal 20 g lufttrockene gallensaure Salze.

Ich werde unten noch einen anderen Beweis dafür liefern, dass die untersuchte Eisbärengalle keine Glycocholsäure enthielt; und die gefundene Relation zwischen Schwefel und Stickstoff konnte also jedenfalls nicht durch die Annahme eines Gemenges von Glycochol- und Taurocholsäure erklärt werden.

Wie diese Relation zu erklären sei, blieb mir lange unklar, und es hat keinen Sinn, die zahlreichen fruchtlosen Versuche, durch fractionirte Fällung die Frage zu lösen, hier mitzuthemen. Ich gehe deshalb sogleich zu den mehr entscheidenden Versuchen über.

Bei der qualitativen Untersuchung der Galle hatte ich die Beobachtung gemacht, dass eine ziemlich concentrirte alkoholische Lösung der Eisbärengalle bei passendem Zusatz von Wasser sich trübte und etwas emulsionsähnlich wurde. Ich habe dieses etwas befremdende Verhalten nach verschiedenen Richtungen verfolgt und ich fand es dabei aus mehreren Gründen immer mehr wahrscheinlich, dass die Eisbärengalle reich an Lecithin oder einer lecithinähnlichen Substanz sei. Ich fand es aus diesem Grunde nothwendig, Bestimmungen des Phosphorgehaltes zu machen.

Da mir nunmehr nur recht kleine Mengen an Eisbärengalle, die nicht schon für andere Zwecke in Arbeit genommen waren, zur Verfügung standen, war ich einige Male genöthigt, die Bestimmung des Schwefels und des Phosphors in derselben Portion zu machen. Ich verfuhr hierbei, wie schon oben (S. 445) angegeben worden ist.

---

1) Pflüger's Archiv, Bd. 59.

0,796 g lieferten 0,2885 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,03965 g Schwefel = 4,99 % S.

Sie lieferten ferner 0,015 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,00419 g Phosphor = 0,526 % P.

B. Die in Alkoholäther löslichen Stoffe.

0,688 g lieferten 0,106 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,01457 g Schwefel = 2,12 % S.

Sie lieferten ferner 0,045 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,01256 g Phosphor = 1,53 % P.

Die Analyse ergab also die folgenden Zahlen für S und P:

	Schwefel	Phosphor
Gallensaure Alkalien	4,99 %	0,526 %
Alkoholätherlösliche Stoffe	2,12 %	1,53 %

Der Gehalt an Phosphor ist also sehr hoch, namentlich in den alkoholätherlöslichen Stoffen. Unter der, allerdings nicht berechtigten Annahme, dass aller Phosphor als Lecithin in der Galle enthalten sei, würden die obigen Zahlen für ein Gemenge der 3 Lecithine, welches Gemenge 3,94 % Phosphor enthält, zu folgenden Ergebnissen führen. Die analysirten gallensauren Alkalien würden 0,104 g und die in Aetheralkohol löslichen 0,319 g Lecithin enthalten haben. Jene enthielten also 13,06 und diese 46,4 % Lecithin. Berechnet man die Lecithinmenge auf ein Gemenge der durch Aether fällbaren und nicht fällbaren Stoffe, deren Relation in diesem Falle 53,16 % ätherfällbare und 46,84 % nicht ätherfällbare war, so würden also die alkohollöslichen Bestandtheile dieser Eisbäregalle eine Menge von 28,96 % Lecithin enthalten haben.

Zu einem Kontrollversuche verwandte ich eine andere Portion Eisbäregalle, die ich im Jahre 1898 erhalten hatte. Diese Galle war dreimal eingetrocknet und in Alkohol gelöst worden. Die ätherfällbaren und die durch Aether nicht fällbaren Stoffe wurden nicht gesondert analysirt. Die Analyse betraf also das zu constantem Gewicht getrocknete Gemenge sämtlicher, nach dreimaligem Eintrocknen und Auflösen in Alkohol, noch in Alkohol löslichen Stoffe.

a) 0,891 g lieferten 0,255 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,03505 g Schwefel = 3,93 % S.

- b) 1,070 g lieferten 0,038 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,010613 \text{ g Phosphor} = 0,9913 \% \text{ P.}$
  - c) 0,582 g zur N-Bestimmung nach Kjeldahl-Willfarth erforderten 9,88 ccm.  $\text{n}/_{10}$  Schwefelsäure = 2,38 % N.
  - d) 0,571 g zur N-Bestimmung nach Kjeldahl-Willfarth erforderten 9,73 ccm.  $\text{n}/_{10}$  Schwefelsäure = 2,39 % N.
- Mittel für den Stickstoff also 2,385 %.

Die alkohollöslichen Stoffe dieser Galle enthielten also 3,93 % S, 0,9913 % P und 2,385 % N. Rechnet man auch hier den Phosphor als ein Gemenge der drei Lecithine um, so erhält man für diese Galle die Zahl 23,5 % Lecithin.

Zu einer dritten Bestimmung verwendete ich endlich die im Jahre 1900 erhaltene Galle (von der Amdrupexpedition). In diesem Falle wurden ebenfalls nicht die gallensauren Salze und die durch Aether nicht fällbaren Stoffe gesondert analysirt. Es wurden die alkohollöslichen Stoffe als Ganzes zu den Bestimmungen verwendet.

0,614 g lieferten 0,178 g  $\text{BaSO}_4 = 0,02447 \text{ g Schwefel} = 3,98 \% \text{ S.}$   
Sie lieferten ferner 0,020 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7 = 0,005586 \text{ g Phosphor} = 0,91 \%.$

Die alkohollöslichen Bestandtheile dieser Galle enthielten also 3,98 % S und 0,91 % P. Nach den oben angeführten Gründen lässt sich also hier ein Gehalt von 23,1 % Lecithin berechnen.

Aus den nun mitgetheilten Analysen ergibt sich also als eine weitere auffallende Eigenschaft der Eisbäregalle der grosse Gehalt derselben an organisch gebundenem Phosphor.

In dem Obigen habe ich, einem allgemein befolgten Principe gemäss, den Phosphor in Lecithin umgerechnet. Dies dürfte allerdings kaum berechtigt sein; durch ein solches Verfahren wird aber ein Vergleich zwischen der Eisbäregalle und anderen Gallen ermöglicht, denn bisher hat man allgemein den Lecithingehalt aus dem Phosphorgehalte berechnet. Bei einem solchen Vergleiche habe ich gefunden, dass in den (verhältnissmässig wenigen) Fällen, in welchen eine Lecithinbestimmung ausgeführt wurde, die Menge des Lecithins sowohl in der Menschen- wie in der Hundegalle im Allgemeinen nur wenige Procente 1—6—7 % der alkohollöslichen Stoffe beträgt.

thin gefunden, nämlich 12,75%. Man könnte also meinen, dass die Eisbärengalle bezüglich des Phosphorgehaltes eine Ausnahmestellung unter den Gallen einnimmt; auf Grund meiner neueren Erfahrungen an der Menschengalle finde ich jedoch eine solche Annahme etwas zu gewagt.

Bei der fortgesetzten Untersuchung der oben S. 453 besprochenen Menschengalle fand ich nämlich zu meinem Erstaunen in ihr einen ebenso hohen Gehalt an Phosphor, wie in der Eisbärengalle. Die alkohollöslichen Stoffe enthielt nämlich einen Gehalt von 1,047% P, was einem Gehalte von 29,75% Lecithin entspricht. Die mit Aether gefällten gallensauren Alkalien enthielten 0,664% P, entsprechend 16,85% Lecithin, und die in Alkoholäther löslichen Stoffe 1,76% P = 44,6% Lecithin. Diese Menschengalle zeigte auch in anderer Hinsicht eine recht grosse Aehnlichkeit mit der Eisbärengalle. Ich werde zu diesen Verhältnissen zurückkommen.

Der grosse Gehalt der Eisbärengalle und in einzelnen Fällen auch der Menschengalle an Phosphor macht eine weitere Erforschung der phosphorhaltigen Gallenbestandtheile sehr erwünscht. Dass Untersuchungen in dieser Richtung an einem so schwer zugänglichen Materiale, wie Galle von Eisbären oder von ganz gesunden Menschen, zu entscheidenden Resultaten führen würden, ist wohl kaum zu erwarten. Dagegen dürfte allem Anscheine nach die Hundegalle ein hierzu geeignetes Material sein.<sup>2)</sup>

Wenn man annimmt, dass aller Phosphor in der Eisbärengalle als Lecithin vorhanden sei, so wird sowohl der trotz der Abwesenheit von Glyccholsäure, verhältnissmässig niedrige Schwefelgehalt, wie der gefundene Stickstoffgehalt

---

1) *Physiol. Chemie*, S. 302.

2) In diesem Zusammenhange will ich bemerken, dass ich allerdings die schon begonnenen Untersuchungen über die Gallen der Polarthiere weiter fortzuführen gedenke, dass ich aber die fortgesetzte Untersuchung der schwefel- und phosphorhaltigen Gallenbestandtheile mir nicht vorbehalten.



erklärlich. In dem S. 459 erwähnten Falle, wo in derselben Galle sowohl der Schwefel- und der Phosphor-, wie der Stickstoffgehalt bestimmt wurden, fand ich 3,93% S, 0,9913% P und 2,83% N. Wird der Gehalt an Phosphor als Lecithin umgerechnet, so erhält man 23,5% Lecithin. Der Gehalt der Galle an gallensauren Alkalien lässt sich aus dem Schwefelgehalte nicht genau berechnen, weil die Eisbären-galle ein Gemenge von Taurocholsäuren enthält, dessen Schwefelgehalt nicht genau bekannt ist. In dem bisher am reinsten erhaltenen Gemenge dieser Gallensalze habe ich aber 5,57% S, 0,1702% P und 2,72% N gefunden. Will man in diesem Falle den Phosphor als von Lecithin herrührend betrachten, so würden die Gallensalze mit 4,3% Lecithin verunreinigt gewesen sein, und der Gehalt der gallensauren Salze an Schwefel würde also 5,82% betragen. Geht man von dieser Zahl aus und nimmt man ein Gemenge von 68% gallensauren Alkalien, 23,5% Lecithin und 8,5% anderen Stoffen an, so lässt sich für ein solches Gemenge 3,93% S und 2,23% N, gegenüber den gefundenen 3,93% und 2,38% berechnen.

Hiermit will ich selbstverständlich nicht behauptet haben, dass in der Eisbären-galle der Phosphor ausschliesslich als Lecithin enthalten sei, selbst wenn man die oben erwähnte jecorinähnliche Substanz als ein Gemenge von Lecithin mit einem schwefelhaltigen Stoffe betrachten wollte. Es gibt im Gegentheil einige Verhältnisse, welche mit der Annahme von Lecithin als dem einzigen, phosphorhaltigen Bestandtheile der Galle schwer zu vereinbaren sind und die ich bisher nicht habe klarlegen können. Meine Untersuchungen über die alkohol-ätherlöslichen Stoffe der Eisbären-galle sind noch nicht abgeschlossen und ich beabsichtige, bei Besprechung dieser Stoffe in dem zweiten Abschnitte, auch Weiteres über die phosphorhaltigen Gallenbestandtheile mitzutheilen.

Das Vorhandensein grösserer Mengen phosphorhaltiger Stoffe — vielleicht hauptsächlich Lecithin — erklärt meine Bedenken gegen das Eindampfen der Eisbären-galle und auch anderer Gallen auf dem siedenden Wasserbade. Es erklärt auch, ausser dem niedrigen Schwefelgehalte und der Relation



durch Aether unlöslich, gallensauren Salze.

Bezüglich dieser letzteren sind indessen die Verhältnisse ein wenig complicirt. Die in Alkohol und Aether löslichen, durch Aether nicht fällbaren Stoffe stellen nach vorsichtigem Eintrocknen, erst auf dem Wasserbade und dann im Exsiccator, eine amorphe, bräunliche, spröde Masse dar, die indessen an der Luft sehr leicht wieder zähe und klebrig wird. Diese Masse löst sich leicht und vollständig in Aether oder Benzol, besonders leicht aber in Chloroform auf. In Aceton ist sie nur zum Theil löslich. Infolge der Löslichkeit in Aether, Chloroform und Benzol hat man keine gallensauren Alkalien hier zu erwarten, aber trotzdem ist die Masse ziemlich reich an Schwefel. So fand ich z. B. in einem Falle 2,12% S (vergl. S. 458) und in der zuletzt untersuchten Galle (aus 1900) konnte ich qualitativ reichliche Mengen Schwefel in den ätherlöslichen Stoffen nachweisen. Hierzu kommt noch, dass die obengenannte Masse einen bitteren, gallenähnlichen Geschmack hat und die Pettenkofer'sche Reaction gibt. Ich konnte mir dies nicht in einfacherer Weise erklären, als durch die Annahme von gallensauren Salzen auch unter den in Chloroform und Benzol löslichen Stoffen. Man wäre sonst zu der Annahme einer besonderen schwefelhaltigen Substanz genöthigt, wofür jedoch keine dringenden Gründe vorlagen.

Ich ging also zu der Untersuchung der ätherlöslichen Stoffe auf einen Gehalt an gallensauren Alkalien über, eine Aufgabe, die nach einigen verfehlten, vorläufigen Untersuchungen in der nachfolgenden Weise leicht gelang.

Ich löste die ätherlöslichen Stoffe in Alkohol, vermischte mit dem doppelten Volumen Aether, und setzte dann das mehrfache Volumen Wasser hinzu. Es entsteht hierbei eine Emulsion, die, wenn man nicht zu stark umschüttelt, allmählich in eine obere, ätherische, und eine untere, wässrige Schicht sich theilt. Hierzu sind allerdings im Allgemeinen ein oder zwei Tage erforderlich und bisweilen trennen sich die beiden Schichten im Laufe von mehreren Tagen nicht gut. In solchen Fällen kam ich gut zum Ziele durch Zusatz von einer Neutral-

salzlösung und ich wählte hierzu das Natriumsulfat, weil es so leicht durch Alkohol von den gallensauren Salzen getrennt werden kann. Nach dem Abfließen der unteren, alkoholhaltigen Wasserschicht wird die im Scheidetrichter zurückgebliebene klare Ätherschicht mit Alkohol und etwas mehr Äther versetzt und mit Wasser von Neuem verdünnt. In dieser Weise kann man die ätherlöslichen Stoffe beliebig oft mit Wasser waschen.

Die Waschwasser wurden gesondert je für sich eingetrocknet und der Rückstand mit Alkohol extrahiert. Sämtliche Alkoholextrakte wurden zuletzt vereinigt und untersucht. Schon aus dem Geschmacke der Waschwasser ging es deutlich hervor, dass sie gallensaure Alkalien enthielten. Namentlich galt dies von dem ersten und den zwei folgenden Waschwässern. Diese hatten den bittersüßen Geschmack der Eisbärengalle. Die folgenden 12 Waschwasser (es wurde im Ganzen 15 Mal gewaschen) hatten einen mehr bitteren, weniger süßen Geschmack, der von einem anderen Taurocholat herrührt. Die letzten Waschwasser enthielten übrigens verschwindend kleine Mengen gelöster Substanz.

Aus den Alkoholextracten der eingetrockneten Waschwasser konnten nunmehr sehr leicht mit Äther die gallensauren Alkalien ausgefällt werden. Nach zweimaligem Lösen in Alkohol und Ausfällen mit Äther wurden sie analysiert. Eine Portion wurde zum Nachweis von Taurin mit Salzsäure gekocht. Das Taurin konnte sehr leicht in typischen Kristallen gewonnen werden, die ausserdem auf einen Gehalt an Schwefel geprüft wurden.

Die rückständigen Mengen der gallensauren Salze wurden zur Bestimmung des Schwefels und des Phosphors verwendet.

- a) 0,615 g lieferten 0,197 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,027077 g Schwefel = 4,40 % S.
- b) 1,049 g lieferten 0,042 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,01173 g Phosphor = 1,117 % P.

Die gallensauren Alkalien enthielten also 4,40 % S und 1,117 % P. Der Gehalt an Phosphor ist auffallend hoch, was also zeigt, dass bei dem Waschen mit Wasser auch phosphorhaltige Stoffe in das Waschwasser übergegangen sind. Auch

übrigens bisher in keinem einzigen Falle gelungen, die Gallensalze vollständig frei von Phosphor zu erhalten.

Bemerkenswerth ist es, dass die aus den Waschwasser gewonnenen Salze der Gallensäuren mit Aether leicht fällbar waren, während sie aus dem Gemenge der ätherlöslichen Stoffe nicht mit Aether gefällt werden konnten. Es sind also in der Eisbärengalle Stoffe vorhanden, welche die Ausfällung der Gallensalze mit Aether aus deren alkoholischen Lösung verhindern können. Hierdurch erwies sich die allgemein geübte Methode zur quantitativen Bestimmung der gallensauren Alkalien als für die Eisbärengalle ganz unbrauchbar, und ich fürchte, dass Aehnliches wenigstens bisweilen auch für andere Gallen gilt. Ich gedenke hier zunächst der in diesem Aufsätze wiederholt erwähnten Menschengalle, die nur 56,44% durch Aether fällbare gallensaure Alkalien und 43,56% in Alkoholäther lösliche Stoffe enthielt. Bei der Analyse der ätherlöslichen Stoffe dieser Galle fand ich in ihnen 0,5572% Schwefel. Dieser Schwefel muss entweder von nicht gefälltem Taurocholat (in diesem Falle 9,35% der ätherlöslichen) oder von irgend einer anderen schwefelhaltigen Substanz herrühren. Die Untersuchung hierüber ist noch nicht abgeschlossen.

Wäscht man die ätherlöslichen Stoffe der Eisbärengalle wiederholt mit Wasser aus, so gehen, wie oben erwähnt, neben den gallensauren Alkalien auch phosphorhaltige Stoffe in das Waschwasser über. Die Menge der letztgenannten Stoffe wird in diesem Falle, im Verhältniss zu den nicht besonders reichlichen gallensauren Alkalien, ziemlich bedeutend. Anders verhält es sich aber, wenn man die mit etwas Aether vermischte alkoholische Lösung sämtlicher Gallenbestandtheile mit Wasser verdünnt. In diesem Falle kann man die gallensauren Salze der Eisbärengalle verhältnissmässig rein und arm an Phosphor erhalten, und hierauf habe ich eine Methode zur Untersuchung dieser Galle basirt.

Die ursprüngliche alkoholische Lösung der Rohgalle wird bei 40—45° C. stark concentrirt und darauf mit Aether zu

beginnenden Fällung versetzt. Durch Zusatz von einer passenden Menge Wasser und vorsichtiges Schütteln kann man ziemlich leicht nach einigem Stehen zwei Flüssigkeitsschichten erhalten. Die obere Aetherschicht ist dunkel gefärbt und enthält ausser den Farbstoffen die in Alkoholäther löslichen Stoffe. Die untere, fast ungefärbte oder höchstens blassgelb gefärbte alkoholhaltige, wässrige Schicht enthält die gallensauren Alkalien neben anderen wasserlöslichen Stoffen. Die beiden Flüssigkeiten können in einem Scheidetrichter sehr leicht getrennt werden. Wichtig ist es aber, dass man die passende Relation zwischen Alkohol, Aether und Wasser findet, was nach einiger Uebung und vorausgegangenem Herumprobiren an kleineren Proben ziemlich leicht gelingt.

Die Aetherschicht wird erst durch freiwillige Verdunstung an der Luft und dann bei ca. 40° von dem Aether befreit. Der Rückstand, in Alkohol gelöst, wird — zur Entfernung noch rückständiger gallensaurer Alkalien — wiederum mit Aether gemischt und durch Mischen mit Wasser gewaschen, eine Procedur, die nöthigenfalls noch zum dritten Male wiederholt werden kann.

Sämmtliche Waschwasser werden vereinigt und auf gallensaure Alkalien verarbeitet. Nach dem Eintrocknen wird der Rückstand mit Alkohol extrahirt und die Lösung durch Filtration von den Salzen getrennt. Das Eintrocknen und Auflösen in Alkohol wird einige Male wiederholt, bis keine ungelösten Salze zurückbleiben, und darauf werden die gallensauren Alkalien mit Aether gefällt. Sie sind in diesem Falle direkt frei von Gallenfarbstoffen.

Bisher habe ich nur einmal Gelegenheit gehabt, diese Methode zu verwenden; sie gab aber sehr gute Resultate. Die gallensauren Alkalien konnten sehr leicht im Exsiccator zu constantem Gewicht getrocknet werden, und sie blieben auch während mehrstündigen Erhitzens auf 105° C., ohne Gewichtsverlust zu erleiden, ganz unverändert. Die Analyse derselben gab folgendes Resultat:

- a) 0,984 g lieferten 0,399 g  $\text{BaSO}_4$  = 0,054839 g Schwefel = 5,57 % S; sie lieferten ferner 0,006 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$  = 0,001675 g Phosphor = 0,1702 % P.

c) 0,347 g zur N-Bestimmung nach Kjeldahl-Willfarth erforderten 6,67 ccm. n/10 Schwefelsäure = 2,69% N, Mittel für den Stickstoff also = 2,72%.

Die analysirten gallensauren Alkalien enthielten also 5,57% S, 0,1702% P und 2,72% N. Dieser Schwefelgehalt war der höchste von mir in verschiedenen Fractionen der Eisbärengalle bisher beobachtete, und die Verunreinigung mit Phosphor war verhältnissmässig sehr gering. Da gewöhnliches Taurocholat 5,96% S enthält, geht aus dieser Analyse hervor, dass die analysirten gallensauren Alkalien wenigstens zum unverhältnissmässig grössten Theile aus Taurocholat bestanden haben. Der Gehalt an Schwefel entspricht nämlich 93% gewöhnlichem Taurocholat. Will man den Phosphor in Lecithin umrechnen, so würde die Menge des letzteren 4,3% betragen, und es blieben also nur 2—3% für Seifen und andere Stoffe übrig. Eine solche Berechnung ist allerdings von geringem Werthe, da die Eisbärengalle mehrere Taurocholate enthält, sie dürfte aber jedenfalls einen weiteren Beweis gegen das Vorkommen von Glycocholat, wenigstens in nennenswerthen Mengen, in der Eisbärengalle liefern können.

Bemerkenswerth ist die Verunreinigung mit phosphorhaltiger Substanz, eine Verunreinigung, die ich bisher in keiner Weise habe gänzlich vermeiden können. Welcher Art dieser phosphorhaltige Stoff ist, kann ich nicht sicher sagen; ich glaube aber, dass es eher um die Jecorinsubstanz als um das Lecithin sich handelt. Es ist übrigens wohl möglich, dass die Galle mehrere phosphorhaltige Stoffe enthält, und gerade die Erfahrungen an der Eisbärengalle machen ein mehr eingehendes Studium der phosphor- und schwefelhaltigen Bestandtheile der Galle sehr erwünscht.

Die alkoholätherlöslichen Stoffe kann man zweckmässig mit Aceton in zwei verschiedene Fractionen trennen. Ueber die bei Untersuchung dieser Fractionen gewonnenen Resultate, wie auch über die verschiedenen Cholalsäuren der Eisbärengalle hoffe ich in dem zweiten Abschnitte berichten zu können.

---

# Ueber Proteinstoffe. Einwirkung des nascirenden Chlors auf Casein.

Von

J. Habermann und R. Ehrenfeld.

(Aus dem Laboratorium für allgemeine und analytische Chemie der k. k. technischen Hochschule in Brunn.)

(Der Redaction zugegangen am 14. April 1901.)

Es ist eine dem forensischen Chemiker geläufige Thatsache, dass trotz der intensiven Einwirkung des nascirenden Chlors auf die Eiweisssubstanz, wie sie in Form von Leichentheilen vorliegt, die Zerstörung derselben nur insofern eine weitergehende ist, als durch die Behandlung der Objecte mittelst Salzsäure und Kaliumchlorat auf dem erwärmten Wasserbade eine Flüssigkeit resultirt, welche durch Reste von Zellstoff und Fett getrübt ist. Beim ruhigen Stehen dieser Flüssigkeit sondern sich die suspendirten Partikelchen theils an der Oberfläche, theils als Bodensatz ab, und es restirt eine völlig klare Flüssigkeit, welche theils durch Abhebern, theils durch Filtration gewonnen werden kann. Verdünnt man diese ganz klare Flüssigkeit hinlänglich stark mit Wasser, so wird sie fast ausnahmslos durch Ausscheidung einer weissen, flockigen Masse neuerdings mehr oder weniger stark getrübt. Diese flockige Substanz lässt sich durch Filtration leicht absondern. Durch dieses Verhalten ist die bei der Zerstörung von Leichentheilen mittelst Salzsäure und Kaliumchlorat angewandte Vorschrift begründet: nach beendigter Zersetzung und noch vor der Filtration die Zersetzungsflüssigkeit mit destillirtem Wasser entsprechend zu verdünnen. Diese von dem einen von uns wiederholt beobachtete Thatsache gab den Anstoss zum Studium des Verhaltens der unveränderten Eiweissstoffe, speciell des Caseins, gegenüber der Einwirkung von Chlor, welches, durch Zusammenbringen von Salzsäure und Kaliumchlorat erzeugt, im statu nascendi auf den Proteinkörper zur Einwirkung gelangt. Dass das Studium dieser Reaction genügendes Interesse darbietet, scheint uns schon in dem Umstande begründet, dass die Einwirkung eines so kräftigen Agens, wie das nascirende Chlor es ist, vielleicht Aufschluss über die oft und mit Be-

Verständlichkeit des gesammten Eiweissmoleküls geben, und vielleicht auch über eine andere Anschauung zu orientiren vermag, die dahin geht, dass das Eiweissmolekül im gewissen Sinne aus einer leicht veränderlichen Hülle und einem ungleich festeren Kerne besteht, welcher selbst der Einwirkung des nascirenden Chlors gegenüber sich als widerstandsfähig erweist.

Die Einwirkung von Chlor und der anderen Halogene auf die Proteinstoffe war, wie bekannt, schon ziemlich häufig Gegenstand des Studiums. Mulder<sup>1)</sup> hatte das Chlor herangezogen bei seinen Bestrebungen: «das Atomgewicht des Proteins mit Gewissheit zu bestimmen», und in neuerer Zeit ist die Einwirkung der Halogene auf die Eiweissstoffe namentlich in der Absicht studirt worden, um durch Ermittlung der maximalen Aufnahmefähigkeit des Eiweisscomplexes gegenüber den Halogenen einen einigermaßen verlässlichen Massstab für die Grösse seines Molekulargewichtes zu gewinnen.<sup>2)</sup>

Dass sich die Tendenz der vorliegenden Arbeit nicht in dieser Richtung bewegt, geht schon aus den vorher gemachten Bemerkungen hervor, und es genügt anzuführen, dass unser Ziel zunächst dahin gerichtet war, eines oder das andere jener Zersetzungsprodukte kennen zu lernen, welche entstehen, wenn Kaliumchlorat und Salzsäure unter Verhältnissen einwirken, wie sie durch jene Vorschriften bedingt sind, die in den Lehrbüchern und Anleitungen der gerichtlichen Chemie zur Zerstörung der organischen Substanz als vorbereitende Operation bei der Prüfung auf Metallgifte empfohlen werden. Dass diese Vorschriften nicht ohne weiteres und buchstäblich auf unsere Untersuchungen angewendet werden konnten, wird sofort einleuchten, wenn man die Verschiedenheit der Ausgangsmaterialien ins Auge fasst. In dem einen Falle, für welchen die Vor-

---

1) Erdmann's Journal f. prakt. Chemie, Bd. XX, Jahrg. 1849.

2) Siehe unter anderen die Abhandlungen von Loew, Journ. f. prakt. Chemie [2] 31; Hopkins, Berl. Berichte, XXX, S. 1860; Hopkins und Pinkus, Berl. Berichte, XXXI/II, S. 1311; Blum, Münch. medic. Wochenschrift, 1896, Nr. 45; ferner Blum und Vaubel, Journ. f. prakt. Chemie [2] 56, 57.

schrift geschaffen wurde, sind die Ausgangsmaterialien Produkte mit 70 und mehr Procent Wasser, während in unserem Falle das fast wasserfreie Casein das Ausgangsmaterial bildete. Es war daher erforderlich, durch eine Reihe von Vorversuchen jene Vorschriften für unseren Zweck zu adaptiren, und es scheint uns nicht überflüssig, einiges über diese Vorversuche mitzutheilen. Bei einem der ersten dieser Vorversuche wurde das möglichst fein gepulverte Casein in einer Porzellanschale mit einer 8—10%igen Salzsäure übergossen, eine entsprechende Menge von Kaliumchlorat hinzugefügt, das Ganze zu einem gleichmässigen Brei durchgerührt und durch etwa 24 Stunden sich selbst überlassen, worauf die Schale auf dem Wasserbade erwärmt und von Zeit zu Zeit Kaliumchlorat in kleinen Antheilen unter fleissigem Umrühren eingetragen wurde. Es gelang nicht, auf diesem Wege eine vollständige Lösung des Caseins zu erzielen. Es hinterblieb vielmehr in jedem Falle ein Rückstand von etwas grauer Farbe, dessen Menge selbst die Hälfte des angewandten Caseins betragen konnte. Gestützt auf diese Erfahrungen, wurde das Ziel, zunächst eine klare Lösung des Proteinkörpers zu erhalten, dadurch zu erreichen gesucht, dass nicht das Casein selbst, sondern Magermilch zum Ausgangspunkte des Vorversuches gewählt wurde. Im Uebrigen wurde bei diesem zweiten Vorversuche so vorgegangen, dass ein Liter Magermilch mit einigen Grammen Kaliumchlorat versetzt und trockenes Chlorwasserstoffgas eingeleitet wurde. Nach vier bis fünf Stunden war die geronnene Milch in eine klare, gelbe Lösung verwandelt und somit der Beweis erbracht, dass das Casein unter der Einwirkung von Salzsäure und Kaliumchlorat vollständig in Lösung gebracht werden kann. Unter sinngemässer Berücksichtigung der bei der Milch gemachten Erfahrungen wurde bei den nun folgenden Versuchen in der Weise verfahren, dass das Casein mit verdünnter Kalilauge von gewöhnlicher Temperatur bis zur Lösung verrieben und nach dem Zusatze einer gesättigten Lösung von Kaliumchlorat Chlorwasserstoffgas eingeleitet wurde. Das Chlorwasserstoffgas wurde bei allen diesen Versuchen in einem dickwandigen Kolben, der zur Hälfte mit concentrirter Salz-



säure durch einen leeren, völlig trockenen Rundkolben, und aus diesem in den Zersetzungskolben geleitet. Wie zu erwarten stand, wurde als erstes Stadium das Coaguliren der alkalischen Caseinlösung beobachtet. Mit der fortschreitenden, intensiven Chlorentwicklung wurde die coagulierte Masse bald von rothen und braungelben Flocken durchsetzt, worauf sich allmählich ein gelber Kuchen bildete, der schliesslich vollständig in Lösung ging. Das Ende der Zersetzung ist durch das Entstehen einer gelben Lösung gekennzeichnet, die je nach den Concentrationsverhältnissen bei Anwendung grösserer Mengen von Kaliumchlorat von etwas krystallinisch ausgeschiedenem Chlorkalium im geringen Maasse getrübt erscheint. Der ganze Process wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt, indem der Zersetzungskolben in einer Schale stand, in welcher Kühlwasser stetig erneuert wurde. Ein zeitweises Durchrühren des am Beginne des Processes ausgeschiedenen Kuchens mit Hülfe eines Glasstabes, sowie häufiges Umschwenken des Zersetzungsgefässes beschleunigen den Gang der Reaction, die in allen Fällen in gleicher Weise und bei Anwendung von nicht mehr als 100 g Casein auch völlig glatt vor sich ging, so dass sie etwa in 48 Stunden zu Ende geführt war. Schliesslich gelangten wir dazu, stets nach folgender Regel zu verfahren: 100 g Casein wurden in circa 700 ccm. einer etwa 5%igen Kalilauge bei gewöhnlicher Temperatur gelöst, 50 g Kaliumchlorat im feingepulverten Zustand hinzugefügt, nach erfolgter Lösung desselben mit dem Einleiten des Chlorwasserstoffgases begonnen und damit so lange fortgefahren, bis die vollständige Lösung erfolgt war, worauf neuerdings kleine Mengen von Kaliumchlorat eingetragen wurden. Diese letzten Mengen Kaliumchlorat bewirkten ein auffällig starkes Schäumen der Flüssigkeit. Die stark chlorhaltige, gelbgefärbte Lösung, welche bei der gekennzeichneten Reaction resultirt, ist, wie schon vorhin angedeutet, durch geringe Mengen von krystallinisch abgeschiedenem Chlorkalium getrübt, welches sich beim ruhigen Stehen vollständig zu Boden setzt. Die Flüssigkeit wurde von

dem aus Chlorkalium bestehenden Bodensatz abgegossen und mit Wasser verdünnt, worauf sich sofort ein voluminöser, flockiger, rein weisser Niederschlag absonderte, der leicht durch Filtration gewonnen werden konnte. Dieses Produkt bildete den Gegenstand unserer Untersuchungen.

Der Körper löst sich im frischen Zustande, so lange er noch feucht ist, in Alkohol, namentlich beim Erwärmen, unter Zusatz von etwas Salzsäure. Er löst sich beim Erwärmen in Wasser, wobei er sich Anfangs zu einer harzartigen Masse zusammenballt, die sodann mit braunrother Farbe in Lösung geht. Diese wässerige Lösung liefert beim Zusatz von Salzsäure einen braunen, flockigen Niederschlag, während in der alkoholischen Lösung durch Wasserzusatz ein flockiger Körper ausgeschieden wird. Eine von Salzsäure freie, alkoholische Lösung scheidet auf Zusatz reichlicher Mengen an Aether ein gelbes Oel ab, das im Vacuum zu einer braunen, gummiartigen Masse eintrocknete, ohne krystallinische Structur anzunehmen. Die Versuche, den Körper mit Hülfe anderer Lösungsmittel, wie z. B. Eisessig etc., in krystallinischer Form zu erhalten, lieferten kein positives Resultat, ebenso blieben die Versuche zur Herstellung von krystallinischen Metallverbindungen resultatlos. Der Körper löst sich mit grösster Leichtigkeit in Aetzlaugen und wässrigem Ammoniak; aus diesen Lösungen wird er durch Salzsäure wieder flockig gefällt. Zur Reinigung wurde der Körper in mässig grossen Wassermengen gelöst, mit Salzsäure gefällt, filtrirt, neuerlich in Wasser gelöst und so weiter. Alle Versuche, den Körper in krystallinischer Form zu gewinnen, und auch die zur Reinigung des Körpers angewandten Methoden liessen uns die unangenehme Thatsache erkennen, dass die Substanz beim Stehen an der Luft ziemlich rasch einer Veränderung unterliegt, was sich äusserlich durch fortschreitende Braunfärbung zu erkennen gibt. Durch diese Veränderung verliert der Körper sein Löslichkeitsvermögen in Wasser und in Alkohol und bildet mit Wasser von gewöhnlicher Temperatur eine aufgequollene Masse. Ebenso erfolglos blieben die Versuche, mit Hülfe von Acetylchlorid, Benzoylchlorid, Alkohol und Chlorwasserstoff-

konnten durch den Geruch und meistens Eisenchlorid Spuren von Phenol nachgewiesen werden. Das Braunfärben der Substanz, das Verschwinden ihrer Löslichkeit in Wasser, die Quellbarkeit der veränderten Substanz im Wasser erinnern lebhaft an jene Vorgänge, welche wir im Allgemeinen als Humificirung der organischen Substanz bezeichnen, ein Vorgang, welchem ja bekanntlich auch die geformten Eiweissderivate unter entsprechenden Verhältnissen unterliegen. Diese Erwägungen führten uns zur Vorstellung, dass der Körper, welcher bei der Einwirkung von nascirendem Chlor auf Casein entsteht und sich durch Wasser aus der salzsauren Lösung abscheiden lässt, und umgekehrt durch Salzsäure aus der wässrigen Lösung sich abscheiden lässt, dem ursprünglichen Proteinstoff noch ziemlich nahe steht. Bevor wir auf die Besprechung jener Versuche eingehen, welche dazu dienen sollten, den eben ausgesprochenen Gedanken experimentell zu prüfen, wollen wir die Ergebnisse der Analyse des Körpers mittheilen.

Die vollkommen aschenfreie Substanz wurde Anfangs im Vacuum über gebranntem Kalk von dem grössten Theile ihrer Feuchtigkeit und der ihr von ihrer Darstellungsweise mechanisch anhaftenden Salzsäure befreit und sodann bei 100° C. im Vacuum bis zur Gewichtsconstanz getrocknet. Sie stellt dann ein braungelbes, stark hygroskopisches Pulver von äusserst bitterem Geschmacke dar, das die Biuretreaction deutlich zeigt. Die Verbrennung dieses Pulvers im offenen Rohre mit vorgelegter Silberspirale, die volumetrische Bestimmung des Stickstoffs nach Dumas, sowie die Chlorbestimmung nach Carius, ergaben die folgenden Resultate in vier verschiedenen Produkten, die separat dargestellt und gereinigt worden waren:

#### I.

0,2022 g gaben 0,3194 g CO<sub>2</sub> und 0,1072 g H<sub>2</sub>O, entsprechend: 43,07 % C und 5,89 % H.

0,2048 g gaben 21,8 ccm. N bei 16° C. und 746 mm. Druck, entsprechend: 12,16 % N.

0,203 g gaben 0,1096 AgCl, entsprechend: 13,34 % Cl.

II.

0,2714 g gaben 0,428 g  $\text{CO}_2$  und 0,125 g  $\text{H}_2\text{O}$ , entsprechend: 42,92 % C und 5,15 % H.

0,201 g gaben 22,7 ccm. N bei 21,5° C. und 749,8 mm. Druck, entsprechend: 12,64 % N.

0,2028 g gaben 0,1152 g AgCl, entsprechend: 14,04 % Cl.

III.

0,2318 g gaben 0,7342 g  $\text{CO}_2$  und 0,115 g  $\text{H}_2\text{O}$ , entsprechend: 44,02 % C und 5,50 % H.

0,2354 g gaben 25,4 ccm. N bei 15° C. und 740,7 mm. Druck, entsprechend: 12,30 % N.

0,2112 g gaben 21,8 ccm. N bei 19° C. und 737,5 mm. Druck, entsprechend: 12,31 % N.

0,2196 g gaben 0,118 g AgCl, entsprechend: 13,28 % Cl.

IV.

0,247 g gaben 0,3934 g  $\text{CO}_2$  und 0,1214 g  $\text{H}_2\text{O}$ , entsprechend: 43,43 % C und 5,46 % H.

0,3006 g gaben 31,3 ccm. N bei 18° C. und 747 mm. Druck, entsprechend: 12,50 % N.

0,2006 g gaben 0,111 g AgCl, entsprechend: 13,68 % Cl.

Die vorhergehende qualitative Analyse hatte der Erwartung gemäss die völlige Abwesenheit des Schwefels ergeben.

Mit Rücksicht auf die leichte Veränderlichkeit der Substanz und die erheblichen Schwierigkeiten ihrer Reindarstellung ist die Uebereinstimmung der in der Tabelle enthaltenen Resultate eine genügende, um mit Sicherheit auf die constante Zusammensetzung des Produktes und die Verlässlichkeit seiner Darstellungsmethode schliessen zu dürfen. Es erübrigte somit nur noch, die Verwandtschaft des Reactionsproduktes von Casein und nascirendem Chlor mit den unveränderten Eiweissstoffen im gewissen Sinne qualitativ nachzuweisen, zu welchem Zwecke die Hlasiwetz-Habermann'schen Zersetzungsmethoden der Proteinstoffe mittelst Salzsäure und Zinnchlorür<sup>1)</sup> und mittelst Brom und Wasser,<sup>2)</sup> sowie die Zersetzung der Eiweisssubstanz mittelst schmelzendem Aetzkali herangezogen wurden. Das für diesen Theil der Untersuchung verwendete Produkt wurde in der Weise gewonnen, dass der aus der

1) Annal. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 169.

2) Annal. d. Chemie u. Pharmacie, Bd. 159.

anhaltenden Flüssigkeit befreit und ohne weitere Reinigung verwendet wurde. Die Zersetzung mittelst Salzsäure, unter Zusatz von Zinnchlorür, ergab nach der Entfernung des Zinns eine farblose Flüssigkeit, die beim Eindampfen am Wasserbade eine schön violette Farbe annahm, ähnlich jener Farbe, wie sie beim Uebergiessen des Caseins mit concentrirter Salzsäure entsteht. Der syrupöse Abdampfrückstand dieser Flüssigkeit erstarrte bald krystallinisch; seine weitere Verarbeitung, die sich genau an die vorgeschriebene Methode hielt, ergab eine grössere Menge von salzsaurer Glutaminsäure, die in den bekannten, schönen, schiefen Prismen aus der mit Salzsäure versetzten, wässerigen Lösung herauskrystallisirte. Zur Constatirung ihrer Identität genügte die Bestimmung ihres Chlorgehaltes, welche nach der Carius'schen Methode ausgeführt wurde.

0,3 g gaben 0,2326 g AgCl, entsprechend 19,17% Cl. Die Formel:  $C_6H_8NO_4 \cdot HCl$  verlangt: 19,25% Cl.

Da die Glutaminsäure als das am meisten charakteristische Produkt angesehen werden kann, welches bei der Spaltung der Proteinstoffe mittelst Salzsäure und Zinnchlorür entsteht, glaubten wir von dem Suchen nach den anderen Spaltungsprodukten dieser Reaction absehen zu können, ohne der Stärke unserer Beweisführung Abbruch zu thun.

Bei der Spaltung mittelst Brom und Wasser musste es sich nur um den Nachweis der Bildung reichlicher Mengen von Bromoform und Bromanil handeln. In den Champagnerflaschen, in denen die Zersetzung unter Druck vorgenommen worden war, lag in allen Fällen das Bromanil, durch humöse Substanz verunreinigt, in Form harziger Massen am Boden, aus welchen durch Zerdrücken unter Alkohol die schönen goldgelben, glänzenden Blättchen des Bromanils gewonnen werden konnten. Sie zeigten alle jene Eigenschaften, wie sie vom Bromanil thatsächlich bekannt sind, demnach insbesondere das so überaus charakteristische Verhalten gegenüber verdünnter Kalilauge. Die Zersetzungsflüssigkeit, welche vom Bromanil durch Abgiessen getrennt worden war, gab bei der Destillation eine

relativ grosse Menge an Bromoform, das nach dem Waschen mit verdünnter Lauge durch seinen Geruch, seinen Siedepunkt und namentlich durch seine leichte Umwandlung in Tetrabromkohlenstoff als solches sichergestellt wurde.

Die Schmelze mittelst Aetzkali endlich ergab die Bildung von verhältnissmässig reichen Mengen an Phenol, das nach dem Ansäuern der kalischen Lösung mit Schwefelsäure und Ausschütteln mittelst Aether, durch den charakteristischen Geruch, sowie durch die bekannten Phenolreactionen mit aller Sicherheit nachzuweisen war. Dass nach dem Auftreten relativ reichlicher Mengen an Phenol in der Kalischmelze die Nachweisung von Tyrosin nicht gelang, konnte aus leicht begreiflichen Gründen nicht überraschen und bedarf keiner weiteren Erörterungen.

Wir haben somit durch eine Einwirkung von 50 g Kaliumchlorat mit Salzsäure auf 100 g Casein, entsprechend einer Menge von 87 g Chlor, deren allmähliche Entwicklung innerhalb eines Zeitraumes von 48 Stunden sich vollzog, einen Körper erhalten, welcher bei der Spaltung mittelst Salzsäure und Zinnchlorür, mittelst Brom und Wasser, sowie bei der Zersetzung mittelst schmelzendem Aetzkali die gleichen Zersetzungsprodukte lieferte wie die unveränderten Eiweissstoffe, oder zu mindestens die nahestehenden Derivate dieser Zersetzungsprodukte, wie beispielsweise das Phenol. Zieht man nun in Betracht, dass der Zersetzungsprocess, dem das Casein unterworfen worden war, eine der energischsten und intensivsten Reactionen darstellt, dann ist wohl der Beweis erbracht, dass die Regel von der leichten Veränderbarkeit des Eiweissmoleküles und dem labilen Gleichgewichtszustande seiner Hauptbestandtheile, wie sie zumeist noch in allen Lehr- und Handbüchern betont wird, keine allgemeine Geltung besitzen kann.

Nach allen Beobachtungen scheint das Albumin und auch andere Eiweissstoffe ein dem Casein analoges Verhältniss bei der Einwirkung von nascirendem Chlor zu zeigen. Wir hoffen in der Lage zu sein, demnächst darüber, sowie über andere Zersetzungs Vorgänge von Eiweissstoffen berichten zu können.

---

# Die Ueberführung des rechtsdrehenden Arginins in die optisch inactive Modification.

Von

Fr. Kutscher.

---

(Aus dem physiologischen Institut in Marburg.)

(Der Redaction zugegangen am 22. April 1901.)

---

In meinen Versuchen<sup>1)</sup> über das «Antipepton Siegfried-Balke» hatte ich aus der Phosphorwolframsfällung, die ich in der Lösung des «Antipeptons» erzeugte, um zu dem «gereinigten Antipepton Siegfried-Balke» zu gelangen, die Hexonbasen Histidin, Arginin, Lysin erhalten. Neben dem gewöhnlichen rechtsdrehenden, durch die Arbeiten von Schulze,<sup>2)</sup> Hedin<sup>3)</sup> und Kossel<sup>4)</sup> bekannt gewordenen Arginin vermochte ich damals ausserdem noch das salpetersaure Salz eines Arginins zu isoliren, das das polarisirte Licht nicht beeinflusste.

Den gleichen Körper habe ich später noch zweimal durch tryptische Verdauung von Fibrin nach einem vereinfachten Verfahren dargestellt. Ich setzte dazu 300 g frisches, gut gewaschenes Fibrin mit 200 g fein gehacktem Pankreas unter 2 Litern Chloroformwasser<sup>5)</sup> zur Verdauung an. Bereits nach 4 Tagen zeigte die Verdauungsflüssigkeit nur mehr schwache Biuretreaction. Von den unverdauten Resten etc. wurde jetzt filtrirt, das Filtrat möglichst genau mit Baryt ausgefällt, die abgeschiedene Fällung abgesaugt und das neue Filtrat mit Salpetersäure schwach angesäuert. Danach wurde demselben so lange 10%ige Silbernitratlösung zugefügt, als ein Nieder-

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 210 u. Bd. XXVIII, S. 88.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXVI, S. 43.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXI, S. 155.

4) Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 176 u. Bd. XXV, S. 165.

5) Siehe Salkowski, Deutsche medic. Wochenschrift. 1888, Nr. 16.

schlag entstand. Dieser wurde durch Filtration entfernt. Dem Filtrat wurde nun weiter Silbernitratlösung zugefügt, bis eine Probe desselben mit Barytwasser eine braune Fällung gab. Darauf wurde das Ganze mit Baryt gesättigt, der entstandene reichliche Niederschlag abgesaugt, vom Filter abgenommen, in verdünnter Salpetersäure gelöst und nach Zugabe von etwas Silbernitrat das Histidinsilber durch vorsichtige Zufügung von Barytwasser vom Argininsilber abgetrennt. Das Histidinsilber wurde abgesaugt, im Filtrat das Argininsilber durch Baryt zur Ausfällung gebracht. Das Argininsilber wurde mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das frei gewordene Arginin nach Entfernung des Silbersulfids etc. mit Salpetersäure neutralisirt. Bei langsamer Krystallisation schied sich nun zuerst das schwerlösliche salpetersaure Salz des inactiven Arginins in Form fester Krusten an den Wandungen der Krystallisationsschaale ab. Durch Umkrystallisiren liess es sich leicht von den letzten Resten rechtsdrehenden Arginins befreien.

Da ich das optisch inactive Arginin bei den Verdauungsversuchen von Fibrin, wo ich darauf achtete, ohne Mühe zu isoliren vermochte, es dagegen niemals unter den Spaltungsprodukten, die bei der Selbstverdauung des Pankreas entstehen, nachweisen konnte, so muss zweifellos das Fibrin die Quelle für die Bildung des optisch inactiven Arginins abgeben. Dieselbe kann sich nun so vollziehen, dass das Fibrin linksdrehendes Arginin bei seiner Spaltung durch Trypsin liefert, welches sich mit dem aus den Eiweisskörpern des Pankreas hervorgehenden rechtsdrehenden zum Racemkörper zusammenlegt, oder aber es kann schon als Racemkörper aus dem Fibrin entstehen. Ueber diese Fragen müssen weitere Untersuchungen entscheiden. Wie dem aber auch sei, jedenfalls nimmt das Fibrin unter den bisher untersuchten Eiweisskörpern eine besondere Stellung ein, da alle anderen Eiweisskörper nur rechtsdrehendes Arginin geliefert haben.

In meinen früheren Mittheilungen hatte ich es noch offen gelassen, ob das aus dem «Antipepton Siegfried-Balke» isolirte optisch inactive Arginin nur die racemische Modification des Arginins sei. Inzwischen ist mir die Ueberführung



Um dies zu erreichen, erhitzte ich zuerst gewöhnliches Arginin mit seinem fünffachen Gewicht concentrirter Schwefelsäure bis zum beginnenden Sieden, entfernte die Schwefelsäure durch Baryt, den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure, concentrirte und neutralisirte die erhaltene Flüssigkeit mit Salpetersäure. Es krystallisirte die schwer lösliche salpetersaure Verbindung des optisch inactiven Arginins. Noch bequemer kommt man zum Ziel, wenn man das neutrale salpetersaure Salz des rechtsdrehenden Arginins zunächst bei 80° C. vom Krystallwasser befreit<sup>1)</sup> und darauf im Trockenschrank 15—20 Minuten auf 210—220° C. erhitzt. Man nimmt die abgekühlte Substanz mit Wasser auf, entfärbt mit Thierkohle und lässt aus nicht zu wenig Wasser langsam das neutrale salpetersaure Salz des optisch inactiven Arginins krystallisiren. Dasselbe scheidet sich in festen Krusten an den Wandungen der Krystallisationsschale ab. Durch nochmaliges Umkrystallisiren ist es leicht vollkommen zu reinigen. Es besitzt alle Eigenschaften des aus Fibrin durch Trypsinverdauung gewonnenen. Im Nachstehenden gebe ich die Belege:

Das aus rechtsdrehendem Argininnitrat dargestellte optisch inaktive Argininnitrat beeinflusste weder im 4- noch im 6-Decimeterrohr das polarisirte Licht. Der Procentgehalt der untersuchten Lösung betrug 4,5.

2 ccm. einer bei 12° C. gesättigten Lösung enthielten 0,0924 g Substanz. Demnach lösen sich bei 12° nur ca. 4,6 g in 100 ccm. Wasser.

0,2015 g verloren, nachdem sie über Schwefelsäure im Vacuum zur Gewichtsconstanz gebracht waren, bei 120° C. nichts mehr an Gewicht. Das optisch inactive Argininnitrat krystallisirt also ohne Krystallwasser.

0,1526 g Substanz gaben über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet bei der Verbrennung 39,2 ccm. Stickstoff. Temperatur 10° C., Bar. 736 mm. Sperrflüssigkeit 25 %ige Kalilauge.

Für  $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HNO_3$

Berechnet

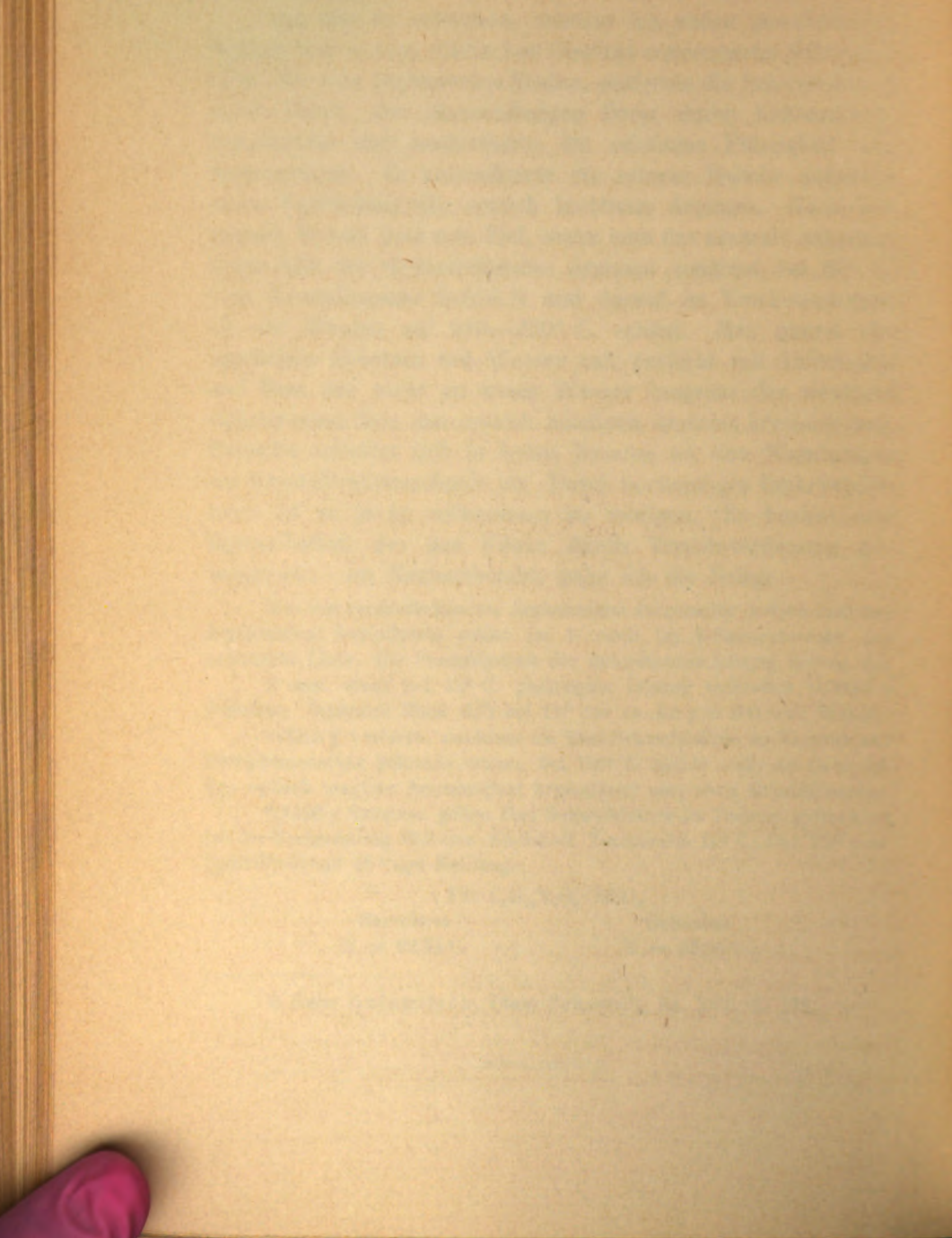
N = 29,54 %

Gefunden

N = 29,90 %.

<sup>1)</sup> Siehe Gulewitsch, Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 178.





# Ueber physiologische Zuckerbildung nach Eiweissdarreichung.

Von

Dr. Ernst Bendix.

---

(Aus dem thierphysiologischen Institute der Königl. landwirthschaftlichen Hochschule in Berlin. Director: Prof. Dr. Zuntz.)

(Der Redaction zugegangen am 30. April 1901.)

---

Dass die verschiedenen Eiweissstoffe im Haushalte des Organismus gleichwerthig seien, ist bei der grossen Verschiedenheit ihrer Zusammensetzung sehr unwahrscheinlich. Und wenn in den Lehrbüchern der Physiologie, wie auch bei klinischen Stoffwechseluntersuchungen ganz allgemein von Eiweiss gesprochen wird, so liegt dies im Wesentlichen wohl daran, dass man erst in neuester Zeit begonnen hat, die Unterschiede der verschiedenen Eiweissstoffe rein chemisch im Reagensglase — kaum noch physiologisch im Thierkörper — zu präcisiren.

Nach einer Richtung hin sind jedoch die Untersuchungen bis zu einem gewissen Abschluss gelangt, welche solche Unterschiede der Eiweisskörper in chemischer Beziehung darthun sollen. Bekanntlich gelang es, bei einem grossen Theile der Eiweisskörper eine Kohlehydratgruppe in ihrem Moleküle nachzuweisen, bei einem kleineren Theile der Eiweisskörper gelang dies nicht. Da sich die genaueren Litteraturangaben über diesen Gegenstand in einem kritischen Referate Blumenthal's zusammengestellt finden, glaube ich mich hier mit den wesentlichsten einschlägigen Daten begnügen zu können.

An Pavy's Namen knüpfen die ersten Untersuchungen auf diesem Gebiete an und sie sind für die späteren Arbeiten grundlegend geworden. Durch die Einwirkungen von mineralischen Säuren oder auch von künstlichem Magensaft auf Eiweisskörper gewann er eine Substanz, welche die gewöhnlichen Zuckerreactionen lieferte, d. h. Fehling'sche Lösung reducirte, die Kaliprobe gab, Osazone bildete u. s. w.

Dass das im Ovalbumin vorkommende Kohlehydrat den Hexosen zuzuzählen sei, bewiesen Blumenthal und Mayer durch Reindarstellung des betreffenden Osazones.

Ovalbumin das Kohlehydrat in natura gewinnen und es auf Grund seiner Elementaranalyse und seiner übrigen Eigenschaften als Glucosamin — oder vielmehr richtiger Chitosamin — präcisiren. Durch die letztgenannte Arbeit wurde der den früheren Autoren immer wieder gemachte Einwand, dass nämlich der Zucker aus dem dem Ovalbumin beigemengten Mucoid stamme, endgültig widerlegt. Das nach Hofmeister's Anleitungen gewonnene krystallinische Ovalbumin bietet volle Garantie für chemische Reinheit. Die von v. Mering schon vor mehr als 10 Jahren ausgesprochene Hypothese, dass die meisten Eiweissstoffe den Glycoproteiden zuzuzählen seien, ist daher bis zu einem gewissen Grade heute als Thatsache anzusehen.

Nachdem nun diese Reagensglasversuche zum Abschluss gelangt sind, erscheint es von Interesse, ihre Ergebnisse auch auf den Thierkörper zu übertragen. Ob also nach Darreichung eines zuckerreichen Eiweisses, wie Ovalbumin, sich auch im Thierkörper reichlich Zucker nachweisen lasse, dagegen nach Darreichung eines zuckerfreien Eiweisses, wie Milcheiweiss, nicht, diese Frage zu entscheiden, soll in vorliegender Arbeit versucht werden.

Die engen Beziehungen zwischen Eiweiss und Zucker im Thierkörper, d. h. dass Eiweiss im Thierkörper Zucker bilden könne, sind den Physiologen und Klinikern schon längst bekannt. Wie aus dem Folgenden hervorgeht, kann ich mich der von Schöndorf letzthin gegebenen Kritik über die von Naunyn, v. Mering, Külz und A. angestellten Versuchen betreffs Glycogenbildung aus Eiweiss nicht anschliessen. Die Physiologen sahen nach Eiweissfütterungen bei ihren Versuchsthieren eine starke Vermehrung des Leberglycogens auftreten und die Kliniker machten bei ihren Fällen von schwerem Diabetes die Erfahrung, dass die erhöhte Zufuhr von Eiweiss auch eine erhöhte Zuckerausscheidung im Gefolge habe.

Zur Entscheidung meiner Frage nach der zuckerbildenden Kraft der verschiedenen Eiweisse waren demgemäss zwei Wege gangbar: einerseits suchte ich den in dem Thierkörper

gebildeten Zucker in den Urin überzuführen und so der Messung zugänglich zu machen, andererseits bestimmte ich den im Thierkörper als Glycogen zurückgehaltenen Zucker nach Darreichung der verschiedenen Eiweisse.

A.

Bei meiner ersten Versuchsreihe war die Versuchsanordnung folgende: die Versuchsthiere, Hunde, wurden glycogenfrei gemacht, sodann wurden an sie die verschiedenen Eiweissstoffe, deren zuckerbildende Fähigkeit im Organismus verglichen werden sollte, verfüttert und der gebildete Zucker vermittelt wiederholter Phlorhizinjectionen in den Harn übergeführt. Nach 20—21 Stunden wurde der Versuch abgegrenzt, indem ebenso wie beim Beginn des Versuches der Hund katheterisirt wurde. Zu diesem Ende musste bei den meisten Hündinnen (wegen der Kleinheit der Thiere) die Harnröhre vermittelt der Fälk'schen Operation zugänglich gemacht werden.

In dem Harn wurde dann der Quotient  $\frac{\text{Zucker}}{N}$  bestimmt, da ja dieser das quantitative Verhältniss des Eiweisszerfalles zur Zuckerausscheidung annähernd anzeigt.

Ehe ich die einzelnen Versuchsergebnisse mittheile, möchte ich einige kurze kritische Bemerkungen zu der gewählten Versuchsanordnung machen. Das Phlorhizin erscheint deshalb zur Zuckerelimination besonders geeignet, weil es vermöge seiner renalen Wirkung den Zucker, sobald er die Nieren passirt, dem Körper entzieht. Folgende Erfahrungen sprechen nämlich dafür, dass die Wirkung des Phlorhizins thatsächlich so zu deuten ist, dass die Anziehungs- und Eliminationskraft der Nierenepithelien für den Blutzucker derartig geändert wird, dass schon die normale Menge von Blutzucker nicht mehr ertragen und in den Harn übergeführt wird: Erstens ist der Zuckergehalt des Blutes bei Thieren, welche vermittelt Phlorhizin glycosurisch gemacht werden, vermindert (v. Mering, Minkowski). Gegentheilige Befunde, dass nämlich der Blutzuckergehalt bei solchen Thieren gegen die Norm erhöht ist, stehen als vereinzelte Curiosa da. Sie würden im Uebrigen auch der Eliminationstheorie insofern nicht widersprechen, als der Verlust

Art eine zeitweilige Uebercompensation des Verlustes stattfindet.

Zweitens fand Minkowski, dass nach Nierenexstirpation der Zuckergehalt des Blutes durch Phlorhizin nicht über die Norm gesteigert wird, und drittens hat Zuntz noch direkter die Frage dadurch entschieden, dass er durch die örtliche Phlorhizinzufuhr zu der einen Niere (Injection in die Arteria renalis) bei dieser Niere eine viel früher eintretende, energischere Zuckerausscheidung veranlasste als wie bei der anderen Niere. Die Eliminationstheorie bei der Phlorhizinwirkung, welche sich für die functionelle Nierendiagnostik so fruchtbar erwiesen hat, kann somit als experimentell erwiesen angesehen werden. Die Anwendung des Phlorhizins geschah in meinen Versuchen subcutan, indem das Phlorhizin nach dem Vorgange von Cremer durch Piperazin in Lösung gebracht wurde.

Die zweite Frage, welche sich bei der Kritik meiner Versuchsanordnung aufdrängt, ist die Frage: warum die einzelnen Versuche schon nach 20—21 Stunden abgegrenzt und nicht vielmehr auf einige Tage ausgedehnt wurden. Dies geschah deshalb, weil bekanntlich nach längerer Darreichung des Phlorhizins die Versuchsthiere heftige Vergiftungserscheinungen zeigen (Durchfälle, Erbrechen, Coma, Krämpfe, plötzlicher Tod). Diese mehrfach von uns in Vorversuchen beobachteten Erscheinungen sind ja hinlänglich bekannt und machen selbstverständlich die Thiere für unsere Fragestellung völlig unbrauchbar. Bei der nur 20stündigen Anwendung des Phlorhizins sahen wir niemals Vergiftungserscheinungen der Thiere.

Eine weitere Frage ist die, ob in dem Harnquotienten  $\frac{\text{Zucker}}{\text{N}}$  thatsächlich das Verhältniss des im Organismus gebildeten Zuckers zu dem gleichzeitig zerfallenden Eiweisse zum Ausdruck gelangt, d. h. ob nicht vielleicht eine Aufstapelung von Zucker oder N in diesen 20 Stunden im Organismus stattfindet, oder vielleicht Zucker im Körper verbrannt und so der Bestimmung im Harne entzogen wird. Die erste Frage nach einer Aufstapelung von Zucker oder Stickstoff glauben wir mit

Bestimmtheit deshalb verneinen zu können, weil nach Phlorhizindarreichungen bekanntlich eine starke Polyurie auftritt und unseren Versuchsthieren Wasser in beliebiger Menge zur Durchspülung des Organismus zu Gebote stand. Dagegen lässt sich die zweite Frage: ob nicht Zucker durch vorherigen Verbrauch im Organismus der Ueberführung in den Harn entgangen sei, nicht mit Sicherheit verneinen, allerdings aber muss der möglicher Weise solcher Art entstandene Fehler bei allen Versuchsthieren deshalb der gleiche gewesen sein, weil alle Versuchsthiere ganz gleich behandelt wurden, und auf Vergleichswerthe kommt es ja hier in erster Linie an.

Weiter sei hervorgehoben, dass die den Thieren gereichte Nahrung nicht nur aus dem zu prüfenden Eiweisse bestehen konnte, sondern dass, um die Thiere zum Fressen zu bewegen, den Eiweisspräparaten eine gewisse Fettmenge hinzugefügt werden musste. Hierdurch kann ja schon darum an den Stoffwechselverhältnissen nichts Wesentliches geändert werden, weil den Thieren ohnedies ihr Körperfett, das ja, wie Schulz gezeigt hat, bei Bedarf in die Circulation übergeht, zu Gebote stand. Die meisten Physiologen und Kliniker nehmen übrigens auch heute an, dass das Fett keine Quelle für den Zucker bilden kann, und ohne auf die ganze Frage nach der Zuckerbildung aus Fett eingehen zu wollen, möchte ich hier nur an die beiden fundamentalen diesbezüglichen Thatsachen erinnern, dass Fettfütterung keine Glycogenbildung veranlasst und dass Fettzufuhr bei Diabetes gravis naturalis und artificialis die Zuckerausscheidung nicht steigert. Sicherlich ist es einstweilen trotz vielfacher dahinzielender Versuche noch nicht gelungen, einen einwandsfreien Beweis für eine im thierischen Organismus vorkommende Zuckerbildung aus Fett beizubringen. Leider lässt sich allerdings auch nicht sagen, dass die Unmöglichkeit einer derartigen Annahme mit Sicherheit erwiesen ist. Immerhin glaube ich annehmen zu dürfen, dass auch bei Annahme einer Zuckerbildung aus Fett meine Resultate ihren Werth behalten, weil bei der gleichmässigen Behandlung der Thiere nicht einzusehen wäre, warum das Fett in den verschiedenen Versuchen verschieden stark bei einer Zuckerbildung betheiligt sein sollte.



Beweis erbracht werden, dass meine Versuchsthiere thatsächlich glycogenfrei waren. Um den Glycogenschwund in ihren Organen zu erzielen, wurden alle uns bekannten, diesem Zwecke entsprechenden Mittel vergesellschaftet angewandt: Die Versuchshunde wurden etwa 8 Tage lang mit sehr fettreicher Nahrung (Schmalz), der nur sehr wenig Eiweiss zugefügt war (Hackfleisch), gefüttert. Kohlehydrate als solche wurden vermieden. Hierbei nahmen die Versuchsthiere fortwährend an Körpergewicht ab. Es folgten darauf 2 Tage absoluten Hungers und am darauffolgenden Tage mussten die Thiere eine grosse Muskularbeit verrichten, d. h. auf der von Zuntz construirten Tretbahn ca. 4 Stunden in schnellem Tempo bergan laufen. In dem grössten Theil meiner Versuche bestimmte ich nicht nur die Zeit, sondern auch den zurückgelegten Weg. Das Minimum desselben betrug 10 km. mit einer Steigung von mehr als 2000 m. Folgende Vorversuche belehrten mich, dass die so behandelten Thiere thatsächlich glycogenfrei waren.

#### Vorversuch I.

Ein gut genährter schwarzer Pudel, von etwa 8 kg Gewicht, erhält 8 Tage lang kohlehydratfreie,<sup>1)</sup> fettreiche Nahrung, hungert 2 Tage und läuft am darauffolgenden Tage 4 $\frac{1}{2}$  Stunden auf der Tretbahn. Er wird darauf sogleich durch Verbluten getödtet und Leber und Muskeln nach der von Pflüger verbesserten Külz'schen Methode auf Glycogen verarbeitet. In der Leber (220 g) finden sich unwägbare Spuren von Glycogen, die Muskeln (115 g) sind völlig glycogenfrei.

#### Vorversuch II.

Ein gut genährter Pintscherhund, 7900 g, hungert wieder nach vorhergehender obenbeschriebener 8tägiger Ernährung 2 Tage und läuft sodann am dritten Tage auf der Tretbahn in 3 $\frac{3}{4}$  Stunden 10 km. mit einer Steigung von 2200 m. Er

---

1) Bei Anwendung des Ausdrucks «kohlehydratfrei» wird den im Fleische vorkommenden Spuren von Kohlehydraten keine Rechnung getragen.

wird gleich darauf durch eine Chloroforminjection ins Herz getödtet und die Leber und Muskeln auf Glycogen verarbeitet: Die Leber (195 g) ist absolut glycogenfrei, in den Muskeln (129 g) finden sich Spuren von Glycogen.

### Vorversuch III.

Kleiner Hund von 4300 g wird genau wie die beiden ersten Thiere durch entsprechende Nahrung, 2 tägigen Hunger und eine Arbeitsleistung von 10 km. Weg mit über 2000 m. Steigung vorbehandelt, sodann durch Verbluten getödtet und Leber- und Muskelglycogen bestimmt: Leber (122 g): Glycogenbestimmung verloren; Muskeln (105 g): absolut frei von Glycogen.

### Vorversuch IV.

Sehr gut genährter Hund, von 8 kg Gewicht, läuft nach 2 tägigen Hunger auf der Treibahn. Laut Aussage des Tourenzählers legte er 10 km. mit über 2000 m. Steigung zurück. Durch Verbluten wird er getödtet und das Muskel- und Leber-Glycogen bestimmt: Die Leber (180 g) enthält 2,5696 g Rohglycogen = 1,886 g Reinglycogen, die Muskeln (153 g) enthalten 0,1245 g Rohglycogen bzw. 0,0742 g Reinglycogen = 0,05 %.

Dieser vierte Vorversuch kann als nicht beweisend gelten. Die sonst geübte 8 tägige Fütterung mit kohlehydratfreier Kost fiel bei ihm fort. Ausserdem aber war die geleistete Arbeit thatsächlich viel geringer, als der Tourenzähler angab. Der Hund war durch seine Verwendung bei früheren anderweitigen Versuchen so gut auf das Laufen auf der Treibahn dressirt, dass seine Arbeitsleistung weit weniger hoch zu veranschlagen ist. Ferner hatte er bei früheren Arbeitsversuchen auf der Treibahn gelernt, sich durch Hinaufklettern an den Seiten der Treibahn dem Laufen zeitweilig zu entziehen. Da er im vorliegenden Versuche nicht ständig unter Aufsicht war, liegt der Verdacht nahe, dass dies auch hier geschehen ist.

Vor Kurzem ist aus dem Pflüger'schen Laboratorium eine Arbeit erschienen, welche beweist, dass die gewöhnlich geübte Kaliaufschliessung der Organe, d. h. Kochen bis zur Lösung in 1—2 %iger Kalilauge, bei der Glycogenbestimmung

wohl durch Anwesenheit concentrirter Lauge als auch durch weit längeres Kochen in der dünnen Lauge eventuell höhere Glycogenwerthe erzielen. Diese Erfahrung verpflichtete mich zu dem folgenden fünften Vorversuch.

#### Vorversuch V.

Ein junger, 5500 g schwerer Dalmatinerhund erhält 6 Tage lang kohlehydratfreie fettreiche Nahrung, hungert 2 Tage und legt am dritten Tag eine Strecke von 7 km. mit etwa 1500 m Steigung zurück. Durch Chloroforminjection ins Herz wird er darauf getödtet und seine Organe folgendermassen auf ihren Glycogengehalt geprüft. Die Leber (204 g schwer) wird in 2 Theile getheilt (Theil I 97 g und Theil II 107 g), ebenso werden von den gemischten Muskeln Theil I = 150 g und ein Theil II = 163 g genommen. In den Leber- und Muskelportionen I wird daraufhin die Kaliumaufschliessung nach der gewöhnlichen Methode, d. h. Kochen mit 1—2%iger KOH-Lösung bis zur Lösung, vorgenommen:

Leberportion I = 97 g enthält Rohglycogen = 0,236 g = Reinglycogen 0,1649 g = 0,17%.

Muskelportion I = 150 g enthält Rohglycogen = 0,1875 g = Reinglycogen 0,1340 g = 0,089%.

Der übrig bleibende Eiweissniederschlag aus diesen ersten Portionen wird darauf nochmals etwa 20 Stunden lang mit dünner (1,5%iger) KOH-Lösung auf dem Wasserbad digerirt und diese Lösung auf ihren Glycogengehalt geprüft. In beiden Organlösungen liess sich nach diesem 20stündigen Aufschliessen kein Glycogen mehr nachweisen.

Die zweiten Portionen Leber- und Muskelsubstanz wurden 6 Stunden lang in 8%iger Kalilösung auf dem Wasserbade digerirt, um so zu constatiren, ob nach dieser Art der Aufschliessung die Organe sich ebenso glycogenarm zeigten. Hierbei ergab sich:

Leberportion II = 107 g enthält Rohglycogen = 0,303 g = Reinglycogen 0,1978 g = 0,184%.

Muskelportion II = 163 g enthält Rohglycogen = 0,2235 g = Reinglycogen 0,1833 g = 0,11%.

Dieser Versuch zeigt also, dass die Versuchsthiere in ihren Organen auch nach dieser Untersuchungsmethode keine für unsere Versuche in Betracht kommenden Glycogenmengen aufwiesen. Ich erinnere daran, dass dieser letzte Hund nicht die normale Arbeitsleistung verrichtet hat.

Nachdem ich so den Beweis erbracht habe, dass ich durch die in den Vorversuchen beschriebene Methode mir glycogenfreie Versuchsthiere beschaffen konnte, komme ich zur Darstellung meiner Fütterungsversuche mit den verschiedenen Eiweisskörpern. Ich wählte als zuckerhaltigen Eiweisskörper das Ovalbumin, wie es in der Technik als feines weisses Pulver nach seiner Fällung in der Hitze durch Säure und Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Aether gewonnen wird (Schering'sches Präparat: Ovalbuminum purum siccum). Als Repräsentant derjenigen Eiweisskörper, welche kein Kohlehydratradical in ihrem Moleküle aufweisen, diente das Milcheiweiss. Und zwar verwandte ich zunächst in den ersten Thierversuchen ein Milcheiweisspräparat, welches eine kleine Beimengung von Milchzucker (1,6%) enthielt, eine Menge, welche, wie sich bei den geringen Mengen Fütterungsmaterials und den grossen ausgeschiedenen Zuckermengen ergibt, keinerlei Einfluss auf die Resultate gewinnen kann. Die beiden letzten Versuche sind mit absolut reinem Casein (Caseinum purissimum Merck) angestellt.

Als dritten, den Eiweissen nahestehenden Körper zog ich noch den Leim, aus welchem bekanntlich auch kein Kohlehydratradical zu gewinnen ist, aus unten näher zu erörternden Gründen in den Bereich meiner Untersuchungen. Die gewöhnliche käufliche weisse Gelatine erschien als das zur Verfütterung geeignetste Leimpräparat. An dieser Stelle sei hervorgehoben, dass ich in mehreren Versuchen genöthigt war, um die Thiere zum Fressen zu bewegen (namentlich bei den Ovalbuminversuchen), kleine Mengen ( $\frac{1}{2}$ —1 g) Liebig's Fleischextract dem Futter zuzufügen. — Da die einzelnen Versuche in ihrer Anordnung genau übereinstimmen, glaube ich mich darauf beschränken zu können, in einer Tabelle die Ergebnisse zusammenzustellen:

**I. Milcheiweißversuche.**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Besondere Bemerkungen
Vorbehandlung	Gewicht	Nahrung	Phlothin-injectionen	Versuchsdauer	Urinmenge	Harn-N	Harn-zucker	Zucker-N	Retinitis-N	
6 Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage $\frac{1}{2}$ stündiges Laufen auf der Treibahn = 11 km. mit 2300 m. Steigung.	4,3 kg	70 g Milch-eiweiss in warmem Wasser	1h = 0,4 g 6h = 0,4 12h = 0,6	1h—9h 20 Stunden	560 ccm.	6,535 g	27,83 g	4,3	+ 3,51 g	
10 Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 2. Hungertag läuft er 3 km. und am 3. Hungertage $8\frac{1}{2}$ km. mit 2400 m. Steigung.	7,7 kg	100 g Milch-eiweiss, 30 g Schmalz	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 12h = 0,8	$\frac{1}{2}$ 2h—10h 20 $\frac{1}{2}$ Stunden	625 ccm.	3,537 g	14,37 g	4,1	+ 11,81 g	Das Versuchstier ist schwanger.
5 Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 12 $\frac{1}{2}$ km. mit ca. 2600 m. Steigung.	4,3 kg	45 g Milch-eiweiss in warmem Wasser	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,4 g 6h = 0,4 12h = 0,8	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	325 ccm.	4,387 g	15,27 g	8,4	+ 2,07 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 11 km. mit 2300 m. Steigung.	7,6 kg	80 g Milch-eiweiss in warmem Wasser	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 12h = 0,8	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	400 ccm.	5,956 g	18,00 g	3,0	+ 5,52 g	Bei Abbruch des Versuchs gelang es nicht, den Hund zu katheterisieren. In Folge dessen wird durch Schlundsonde dem Hund 500 ccm. Wasser eingegeben. Kurze Zeit darauf Entleerung von 850 ccm. Urin mit nur $\frac{7}{10}$ g Zucker, sodass diese ganze Quantität Urin aus der Berechnung fortfällt.
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 12 $\frac{1}{2}$ km. mit 2600 m. Steigung.	5,0 kg	50 g Caseinum purissimum, 20 g Fett	2h = 0,5 g $\frac{1}{2}$ 7h = 0,5 12h = 0,5	2h— $\frac{1}{2}$ 10h 19 $\frac{1}{2}$ Stunden	250 ccm.	2,715 g	14,50 g	5,4	+ 4,53 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 10 km. mit 2150 m. Steigung.	5,0 kg	50 g Caseinum purissimum in warmem Wasser	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,5 g 7h = 0,5 12h = 0,75 g	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	400 ccm.	5,640 g	18,00 g	8,2	+ 1,51 g	

**II. Ovalbuminversuche.**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Besondere Bemerkungen
Vorbehandlung	Gewicht	Nahrung	Phlorhizin-injectionen	Versuchsdauer	Urin-menge	Harn-N	Harn-zucker	Zucker — N	Retinirter N	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 14 km. mit ca. 3000 m. Steigung.	7,6 kg	60g Ovalbum., 15 g Fett, ca. 0,5 g Fleisch- extract	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 „ 12h = 0,8 „	$\frac{1}{2}$ 2h—10h 21 Stunden	400 ccm.	2,904 g	5,20 g	1,8	+ 5,98 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 10 km. mit 2160 m. Steigung.	4,2 kg	30g Ovalbum., 10 g Fett, Spur Fleisch- extract	2h = 0,4 g 6h = 0,4 „ 12h = 0,8 „	2h— $\frac{1}{2}$ 10h 19 $\frac{1}{2}$ Stunden	500 ccm.	3,330 g	8,25 g	2,5	+ 1,11 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 13 km. mit 2700 m. Steigung.	7,6 kg	80g Ovalbum., 20 g Fett	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 „ 12h = 1,0 „	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	350 ccm.	5,428 g	18,37 g	3,4	+ 6,41 g	Der Harn enthält Spuren Albumen.
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 10 km. mit 2160 m. Steigung.	7,7 kg	82g Ovalbum., ca. 1,5 g Fleisch- extract	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 „ 12h = 0,8 „	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	300 ccm.	4,722 g	19,20 g	4,0	+ 7,41 g	Der Harn enthält Spuren Albumen.
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 13 km. mit 2700 m. Steigung.	5,0 kg	30g Ovalbum., ca. 15 g Fett	2h = 0,5 g $\frac{1}{2}$ 7h = 0,5 „ 11h = 0,5 „	2h— $\frac{1}{2}$ 10h 19 $\frac{1}{2}$ Stunden	300 ccm.	5,688 g	9,60 g	1,7	— 1,248 g	An der Injections- stelle bildet sich ein Abscess nach 2 Tagen.



### III. Leimversuche.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Besondere Bemerkungen
Vorbehandlung	Gewicht	Nahrung	Phlorhizin-injectionen	Versuchsdauer	Urin-menge	Harn-N	Harn-zucker	Zucker-N	Retinirter N	
6 Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er ca. 9 km. mit ca. 2000 m. Steigung.	4,3 kg	50 g Gelatine, 25 g Fett, Wasser	$\frac{1}{2}$ 5h = 0,4 g $\frac{1}{2}$ 9h = 0,4 » $\frac{1}{2}$ 2h = 0,4 » $\frac{1}{2}$ 8h = 0,4 »	$\frac{1}{2}$ 5h— $\frac{1}{2}$ 1h 20 Stunden	650 ccm.	5,947 g	17,22 g	2,9	+ 2,57 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 14 km. mit 3000 m. Steigung.	7,6 kg	60 g Gelatine, 15 g Fett, Wasser	1h = 0,8 g 6h = 0,8 » 12h = 0,8 »	1h—9h 20 Stunden	450 ccm.	8,586 g	14,85 g	1,7	+ 1,63 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 10 km. mit 2150 m. Steigung.	7,6 kg	60 g Gelatine, Wasser	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 » 12h = 0,8 »	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	650 ccm.	12,315 g	19,50 g	1,6	— 2,10 g	
Mehrere Tage kohlehydratfreie Nahrung, 2 Tage Hunger, am 3. Tage läuft er 13 km. mit 2800 m. Steigung.	7,6 kg	50 g Gelatine, 20 g Fett, 1 g Fleisch-extract Wasser	$\frac{1}{2}$ 2h = 0,8 g 6h = 0,8 » 12h = 1,0 »	$\frac{1}{2}$ 2h— $\frac{1}{2}$ 10h 20 Stunden	400 ccm.	6,756 g	21,20 g	3,3	+ 1,76 g	

Es fragt sich nun, welche Schlüsse man aus den in der Tabelle zusammengestellten Werten für unsere Fragestellung ziehen darf. Wie schon oben erwähnt, kommt es nur auf den Quotienten  $\frac{\text{Zucker}}{N}$  als Vergleichswerth an. Die absoluten Werte für den Zucker lassen deshalb natürlich keine Vergleichung zu, weil sie von der Menge resorbirten Eiweisses, von der Grösse des Versuchstieres u. s. w. abhängig sind.

Dieser Quotient  $\frac{\text{Zucker}}{N}$  ist nun, wie aus der Tabelle hervorgeht, in den einzelnen der verschiedenen Eiweissreihen ein keineswegs constanter, vielmehr differiren die Werthe namentlich in der Ovalalbuminreihe um ein recht Beträchtliches.

Berechnet man aber die Mittelwerthe des Quotienten  $\frac{\text{Zucker}}{N}$

und nach der Formel  $R = 0,6745 \sqrt{\frac{(vv)}{n(n-1)}}$  den wahrscheinlichen Fehler derselben in den einzelnen Eiweissreihen, so erhält man für die

Milcheiweissreihe den Werth =  $3,9 \pm 0,25$ ,  
für die

Ovalbuminreihe den Werth =  $2,7 \pm 0,30$   
und für die

Leimreihe den Werth =  $2,4 \pm 0,29$ .

Es hat ja allerdings sein Missliches, auf kleine Zahlenreihen die Wahrscheinlichkeitsrechnung anzuwenden; immerhin wird man aber beim Vergleich der Mittelwerthe, sowie auch beim Vergleich der Einzelwerthe der verschiedenen Eiweissreihen untereinander folgenden Schluss gerechtfertigt finden: Beim Phlorhizin-Diabetes wird nach Fütterung eines ein Kohlehydratradical enthaltenden Eiweisses, wie z. B. Ovalbumin, keineswegs, wie man aprioristisch annehmen sollte, mehr Zucker gebildet, als nach Verfütterung eines Eiweisses, welches kein Kohlehydratradical enthält, wie z. B. Milcheiweiss. In unseren Versuchen scheint vielmehr im Gegentheil nach Casein im Tierkörper eine etwas grössere Zuckermenge entstanden zu sein, als nach dem Ovalbumin. Hiernach lässt sich also ein Einfluss von dem im Eiweiss vorkommenden Kohlehydratradical



Schwankungen der Einzelwerthe noch der weiteren Bestätigung bedürfen, sind ein neuer Beweis dafür, wie gefährlich es ist, aus Reagensglasversuchen weitgehende Schlüsse für die Vorgänge im Thierkörper zu ziehen, und das Dunkel, welches bisher über der im Organismus vorkommenden Zuckerbildung aus Eiweiss schwebte, ist also keineswegs, wie man wohl anfänglich anzunehmen berechtigt war, durch den chemischen Nachweis eines Kohlehydratradicals im Eiweisse gelichtet worden. Es mag ja immerhin möglich sein, dass eine Abspaltung des im Eiweisse präformirten Kohlehydrates im Organismus vorkomme — wenigstens geht das Gegentheil von dieser Annahme aus unserem Versuche nicht hervor; sicher aber ist dann diese Art der Zuckerbildung aus Eiweiss von so nebensächlicher Bedeutung, dass sie völlig verdeckt wird durch eine andere Art der Zuckerbildung aus Eiweiss, deren Wesen bisher noch unbekannt ist und worüber man höchstens Vermuthungen aussprechen kann.

Die Hypothese, welche zu der Erklärung der Zuckerbildung aus Eiweiss heute von sehr vielen und gewichtigen Forschern vertreten wird, ist diejenige, welche das Leucin und entsprechende Amine als ein Zwischenglied in dem Eiweisszuckerabbau anspricht. Bekanntlich ist ja das Leucin ein Hauptspaltungsprodukt des Eiweisses, und ein Vergleich der Constitution des Traubenzuckers und des Leucins ergibt Beziehungen beider zu einander. Eine gewichtige Stütze erhielt die Leucinthorie durch die Beobachtung, dass nach Leucinfütterung ein deutlicher Glycogenansatz in der Leber zu erzielen sei. (Cohn.) Um die Leucinthorie in meiner Versuchsanordnung zu prüfen, zog ich zum Vergleiche noch den Leim heran, einen den Eiweissen sehr nahe verwandten Körper, aus dem sich bekanntlich ähnlich viel Leucin gewinnen lässt, wie aus dem Casein. Bei einem Vergleich der in meinen Versuchen gewonnenen Casein- und Leimwerthe ergibt sich aber nun, dass hier nach der Leimfütterung viel weniger Zucker gebildet wurde als nach Umsetzung gleicher Mengen Caseins,

und dieses Ergebniss spricht nicht für die Annahme, dass der Weg von Eiweiss zum Zucker über das Leucin führen muss.

Als bemerkenswerther Nebebefund bei den mitgetheilten Versuchen zeigt sich, dass bei den durch Hunger und Arbeit in ihrem Körperbestande reducirten Thieren die N-Retention während der folgenden 20 Stunden eine auffallend hohe ist, am niedrigsten nach Darreichung von Leim, der ja bekanntlich nur Eiweiss zu sparen — nicht zu ersetzen vermag.<sup>1)</sup> Ein Theil des als retinirt bezeichneten N darf dabei allerdings als noch nicht resorbirt angesehen werden, namentlich in den Versuchen, bei welchen die Thiere nicht sofort zu Beginn der 20stündigen Beobachtungszeit das ganze Futter auf einmal gefressen haben, sondern einen Theil desselben erst später.

Vergleicht man nun die bei unserer Versuchsanordnung für das Verhältniss von Zucker und Stickstoff erhaltenen Werthe mit den von anderen Autoren erhaltenen Werthen, so differiren sie nicht wesentlich von diesen. Bekanntlich hat Minkowski bei seinen hungernden pankreaslosen Hunden für das Verhältniss von D zu N die Zahl 2,8 eruiert, welche etwa dem Mittelwerth aus allen meinen Versuchen entsprechen würde. Andere Autoren (von Mering, Prausnitz, Miura u. A.) haben bei hungernden Phlorhizin-Thieren höhere Werthe erhalten, bis 4—5. Zur Entscheidung der Frage, inwieweit diese Verhältnisszahl nach Darreichung verschiedener Eiweissarten beeinflusst wird, liegt eine Arbeit von Halsey vor. Die Resultate Halsey's kann ich jedoch in Uebereinstimmung mit anderen Autoren (Lüthje) deshalb nicht für beweiskräftig halten, weil seine Versuchsthierc bei der langen Anwendung hoher Phlorhizindosen so starke Vergiftungssymphome zeigten, dass ihr Stoffwechsel gegen die Norm erheblich verändert sein musste. Halsey selbst gibt in seinen Versuchsprotokollen als solche Vergiftungserscheinungen starke Durchfälle, Erbrechen, komatöse Zustände, Delirium, plötzlichen Tod u. s. w. an. Bei seiner Versuchsanordnung ist das auch nicht verwunderlich: er liess

---

<sup>1)</sup> Der Koth-N blieb bei den völlig normal verdauenden Thieren unberücksichtigt.

ausgeschiedenem Traubenzucker und Stickstoff sich eingestellt hatte, und darauf wurden die verschiedenen Eiweissarten (Casein, Hühnereiweiss) mehrere Tage lang verfüttert, um den Einfluss dieser Fütterungen auf das Verhältniss von D zu N studirt. Aus Halsey's Betrachtungen geht hervor, dass in seinen Versuchen das Ovalbumin auf 100 g Eiweiss 6—7 g Zucker mehr liefert als das Casein. Diese Differenz ist aber so geringfügige, dass auch angesichts dieser Versuche, ja aus oben angegebenen Gründen wenig beweisend erscheinen, man noch immer den gleichen Schluss, wie aus den hier mitgetheilten Versuchen, ziehen kann: beim Phlorhizin-Diabetes der Hunde lässt sich ein deutlicher Einfluss des Eiweiss enthaltenen Kohlehydratradicales auf die Zuckerausscheidung nicht nachweisen.

## B.

Der zweite Weg zur Entscheidung unserer Fragestellung nach der zuckerbildenden Kraft der verschiedenen Eiweisskörper war, wie schon oben erwähnt, der, nach Verfütterung derselben an sicher glycogenfreie Thiere das gebildete Glycogen zu bestimmen.

Natürlich darf man sich nicht damit begnügen, bei dergleichenartigen Untersuchungen etwa nur das Leberglycogen oder das Glycogen eines Theiles der Muskeln zu bestimmen, sondern muss vielmehr das ganze Thier auf seinen Glycogengehalt prüfen. Unsere Versuchsanordnung war dementsprechend folgende: An Hunde, welche nach der in den Vorversuchen bewährten Methode glycogenfrei gemacht waren, wurde mehrere Tage das zu prüfende Eiweiss verfüttert. Zur Deckung des calorischen Nahrungsbedarfes war eine Fettbeimengung nöthig (Schmalz), die bekanntlich nach dem übereinstimmenden Urtheile aller Autoren ohne Einfluss auf die Glycogenie des Organismus ist.<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Wie schon oben erwähnt, kann ich die gegen eine Glycogenbildung aus Eiweiss erhobenen Einwände nicht als beweiskräftig erkennen.

Die Glycogenbestimmungen wurden in den durch Chloroform getödteten Thieren nach der von Pflüger verbesserten Külz'schen Methode vorgenommen, und zwar gesondert in der Leber und dem übrigen Thierkörper. Nach Herausreissen der Leber aus dem frischgetödteten Thiere wurde die Haut schnell abgezogen, die übrigen Bauch- und Brusteingeweide herausgenommen und das Thier in der Sagittallinie durchgesägt und eine Hälfte mit einer Niere, einer Lunge, der halben Milz und dem halben Herzen verarbeitet.

Verfasser bediente sich der älteren Pflüger-Külz-Brücke'schen Methode der Glycogenbestimmung, welche nach Pflüger's eigener Angabe keine grösseren Fehlerquellen zu enthalten scheint, als die neuere Methode, weil er in ihrer Handhabung bei Beginn der Versuche bereits eine grössere Uebung besass.

#### Versuch I.

Ein weiblicher Foxterrier, 5520 g schwer, lebt ca. 10 Tage von kohlehydratfreiem Futter, hungert 2 Tage und legt am 3. Tage einen Weg von 15 km. mit ca. 3000 m. Steigung zurück. An den darauffolgenden 4 Tagen erhält er je 50 g Caseinum purissimum und 50 g Schmalz, also im Ganzen 200 g Casein und 200 g Schmalz. Er wird durch Chloroform-injection ins Herz getödtet. In der Leber (240 g) findet sich:

Rohglycogen = 8,3184 g,

Reinglycogen = 6,413 g.

Der übrige Thiercadaver wird exenterirt und nach Abhäuten in der Sagittalen durchgesägt. Die eine Thierhälfte wiegt 1750 g, die andere Thierhälfte sammt einer Niere, einer Lunge, dem halben Herzen und der halben Milz wiegt 1800 g und enthält 6,1655 g Rohglycogen. In beiden Thierhälften findet sich:

Rohglycogen = 12,1597 g,

Reinglycogen = 7,9646 g.

Im ganzen Thiere = 14,378 g Reinglycogen.

Die während der vier Versuchstage gelassene Urinmenge beträgt 650 ccm. mit einem N-Gehalt von 24,9386 g, N-Retention + 6,5 g.

kohlehydratfreiem Futter, hungert 2 Tage und legt am 3. Tage einen Weg von 15 km. mit über 3000 m. Steigung zurück. Er erhält an den darauffolgenden 5 Tagen je 55 g Caseinum purissimum + 55 g Schmalz, im Ganzen also 275 g Casein + 275 g Fett. Er wird durch Chloroform getötet. In der Leber (324 g) findet sich:

Rohglycogen = 13,876 g,

Reinglycogen = 11,54 g.

Die eine Thierhälfte wiegt 2500 g, die andere Thierhälfte sammt einer Niere, einer Lunge, dem halben Herzen und der halben Milz (2700 g) mit 14,196 g Rohglycogen. In den beiden Hälften findet sich:

Rohglycogen = 27,398 g,

Reinglycogen = 17,92 g.

Im ganzen Thiere = 29,46 g Reinglycogen.

Die während der vier Versuchstage gelassene Urinmenge beträgt 950 ccm. mit einem N-Gehalt von 23,799 g. Es wurde aber beim Töden des Thieres eine gewisse Harnmenge verloren, so dass über die N-Bilanz nichts ausgesagt werden kann.

### Versuch III.

Junger Foxterrier, 3880 g, hungert nach vorhergehender 8 tägiger Fetteiweissfütterung 2 Tage, läuft am 3. Tage 11 km. mit ca. 2500 m. Steigung. An den darauffolgenden 4 Tagen erhält er viermal je 40 g Ovalbumin (Schering'sches Präparat) + 4 × 40 g Schmalz, zusammen 160 g Ovalbumin + 160 g Schmalz. Während der Versuchstage leidet der Hund an häufigen lehmfarbenen Durchfällen, macht einen kranken Eindruck. Er wird durch Chloroform getötet. In der Leber (193 g) findet sich:

Rohglycogen = 0,3069 g,

Reinglycogen = nicht bestimmt.

Die eine Thierhälfte wiegt 1280 g, die andere 1270 g. In beiden Thierhälften findet sich:

Rohglycogen = 0,3419 g,

Reinglycogen = nicht bestimmt.

Der während der vier Versuchstage gelassene Urin beträgt 500 ccm. mit 9,990 g N. N-Retention (beziehungsweise diarrhoische Verluste) + 12,68 g. Im Urin Albumen nachweisbar.

#### Versuch IV.

Ausgewachsener männlicher Hund, 6400 g schwer, hungert nach vorhergehender 8 tägiger Fetteiweissfütterung 2 Tage lang und läuft am 3. Tage 12 km. mit etwa 2700 m. Steigung. An den darauffolgenden 3 Tagen erhält er 3 mal 55 g Ovalbumin (Schering'sches Präparat) +  $3 \times 55$  g Schmalz. Während der Versuchstage leidet der Hund an häufigen lehmfarbenen Durchfällen, auch an Erbrechen. Er wird durch Chloroform getödtet. In der Leber (225 g) findet sich:

Rohglycogen = 1,3030 g,

Reinglycogen = nicht bestimmt.

Die eine Thierhälfte wiegt 2150 g, die andere Thierhälfte 2350 g, mit einem Rohglycogengehalt von 2,1768 g. In beiden Hälften findet sich also:

Rohglycogen = 4,1690 g,

Reinglycogen = nicht bestimmt.

Im ganzen Thiere also = 5,472 g Rohglycogen.

Der während der Versuchstage gelassene Urin ist durch Erbrochenes verunreinigt, so dass sich über die N-Bilanz nichts aussagen lässt.

Das auffallende Ergebniss der letzten beiden Versuche, dass nämlich trotz der hohen Dosen von reinem Eiereiweiss eine verhältnissmässig so geringe Menge Glycogen gebildet wurde, veranlasste mich, zu untersuchen, wie das verfütterte Präparat vom Hunde ausgenutzt wurde, d. h. zu untersuchen, ob die schwachen Glycogenbildungen vielleicht dadurch zu erklären seien, dass die grösste Menge des verfütterten Eiweisses überhaupt nicht resorbirt und mit dem Koth wieder ausgeschieden sei. Der Ausnutzungsversuch wurde in der Weise angestellt, dass ein 6200 g schwerer Hund genau so wie die übrigen Thiere vorbehandelt wurde, sodann erhielt er 40 g des Ovalbuminpräparates (5,9 g N) mit 40 g Schmalz.

gelang diese Abgrenzung insofern nicht sehr gut, als zweifellos kieselsäurehaltiger Koth noch mit untersucht wurde und so wahrscheinlich eine zu grosse Kothmenge untersucht wurde. Hierdurch wurde der Werth für den Kothstickstoff zu hoch befunden. Er betrug 0,846 g, das verfütterte Eiweiss war also bis zu 86% etwa verwerthet worden. Der Harn-N betrug 2,085 g und die N-Retention (wie sie bei den früheren Versuchen berechnet wurde) 3,815 g.

Dieser Versuch zeigt also, dass die Ausnützung des Eiweisses bei einmaliger Darreichung des Präparates eine genügende war. Immerhin kann bei der längeren Darreichung im Versuch III und IV die Ausnützung in Folge von Darmreizung geschädigt worden sein und so der geringe Glycogenansatz zu erklären sein.

Daher wurden die Versuche noch mit nativem, nicht denaturirtem Eiereiweisse wiederholt. Dieses frische Eiereiweiss ist insofern weniger gut zu gebrauchen, als das präparirte, weil es wahrscheinlich geringe Spuren freien Kohlehydrates enthält. Allerdings sind die in der Litteratur enthaltenen Angaben über die Menge des im Eiereiweisse vorkommenden freien Kohlehydrates ziemlich schwankende, wahrscheinlich zu hohe, da bei der Methode ihrer Bestimmung eine Abspaltung von an Eiweiss gebundenem Zucker nicht ausgeschlossen zu sein scheint. Sicherlich aber sind die im Folgenden mitgetheilten Glycogenmengen zu hoch, um aus dem beigemengten Kohlehydrat erklärt zu werden.

#### Versuch V.

Junger, 4440 g schwerer männlicher Hund hungert 2 Tage nach vorausgegangener 8 tägiger Fetteiweissdiät, am 3. Hungertage läuft er über 10 km. mit 2200 m. Steigung. An den darauffolgenden 3 Tagen erhält er 3 mal je 300 g frisches Eiereiweiss, dem nur einige Tropfen einer concentrirten Saccharinlösung zugesetzt wurden, im Ganzen also 900 g frisches Eiereiweiss mit 117 g Eiweissgehalt. Während der 5 Ver-

suchstage Durchfälle. Er wird durch Chloroform getötet. In der Leber (143 g) findet sich:

Rohglycogen = 2,9720 g,

Reinglycogen = 2,5256 g.

Die eine Thierhälfte wiegt 1310 g, die andere Thierhälfte 1450 g, mit einem Rohglycogengehalt von 4,480 g. In beiden Hälften findet sich also:

Rohglycogen = 8,5270 g,

Reinglycogen = Bestimmung verloren.

Urinmenge: 600 ccm., Spuren Albumen; N-Gehalt = 5,328 g (Verlust an Urin).

### Versuch VI.

Junger männlicher Hund von 5300 g wird 8 Tage bei Fetteiweissnahrung gehalten, hungert sodann 2 Tage und legt am 3. Hungertage einen Weg von 10 km. mit 2200 m. Steigung zurück. An den 2 darauffolgenden Tagen erhält er 2 mal 200 g frisches Eiereiweiss + 2  $\times$  50 g Schmalz und am 3. Tage 300 g frisches Eiereiweiss + 50 g Schmalz, im Ganzen also 150 g Schmalz + 700 g frisches Eiereiweiss, mit einem Gehalt von 91 g reinem Eiweiss. Während der Versuchstage Durchfälle. Der Hund wird durch Chloroform getötet. In der Leber (137 g) findet sich:

Rohglycogen = 3,2240 g,

Reinglycogen = 2,9635 g.

Die eine Thierhälfte wog 1790 g und die andere Thierhälfte 1750 g, mit einem Rohglycogengehalt von 5,2955 g. In beiden Thierhälften findet sich also:

Rohglycogen = 10,711 g,

Reinglycogen = nicht bestimmt.

Urinmenge = 850 ccm. mit 6,4260 g N. Spuren Albumen.

### Versuch VII.

Junger Hund von 6200 g hungert nach vorausgehender 10tägiger Fetteiweissnahrung 2 Tage und legt am 3. Hungertage einen Weg von 14 km. mit 3000 m. Steigung zurück. An den darauffolgenden 3 Tagen erhält er 3 mal je 60 g Gelatine + 60 g Schmalz, im Ganzen also 180 g Gelatine + 180 g Schmalz. Während der Versuchstage 2 mal Er-



form getödet. In der Leber (250 g) findet sich:

Rohglycogen = 5,9600 g,

Reinglycogen = 5,2386 g.

Urin durch Erbrochenes verunreinigt.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass (entsprechend den bisherigen Annahmen) nach Verfütterung von Eiweisskörpern reichliche Glycogenbildung in der Leber sowie im übrigen Thierkörper stattfindet. Und zwar sind nicht etwa nur diejenigen Eiweisskörper als Glycogenbildner anzusprechen, welche ein Kohlehydratradical in ihrem Moleküle enthalten (Ovalbumin), sondern auch kohlehydratfreie Eiweisskörper (Casein, Gelatine). Diese Ergebnisse stehen gut in Uebereinstimmung mit Versuchen, wie sie Külz, v. Mering u. A. mitgetheilt haben, deren Beweiskraft Schöndorff neuerdings in der oben citirten Arbeit bestritten hat. Schöndorff selbst stellte Caseinfütterungsversuche an Fröschen an und fand danach keine Glycogenbildung, Versuche, welche von Blumenthal und Wohlgemuth auch für Leim bestätigt werden konnten. Diese Versuche bilden einen scheinbaren Gegensatz zu meinen sowie den oben erwähnten Ergebnissen. Der Gegensatz ist deshalb nur ein scheinbarer, weil Ergebnisse, die beim Kaltblüter gewonnen sind, keineswegs ohne Weiteres auf den Warmblüter übertragen werden dürfen. Denn es ist wohl verständlich, dass im calorischen Haushalte des Kaltblüters und des Warmblüters das Glycogen eine ganz verschiedene Rolle spielen muss: Der Kaltblüter hat nur einen beschränkten Bedarf an Glycogen, wie daraus hervorgeht, dass selbst in der langen Hungerperiode des Winters sein Glycogen keineswegs schwindet, sondern vielmehr ganz beträchtliche Mengen in seinem Körper zurückbleiben (J. Athanasiu, E. Pflüger). Ganz anders offenbar liegen die Verhältnisse beim Warmblüter: Hier ist der Glycogenstoffwechsel ein viel regerer. Es ist bekannt, wie schnell durch Arbeit sein Glycogen schwindet, und wie schnell es sich wieder ansetzt. Sogar im Hunger scheint auf Kosten des eigenen Körpermaterials eine Neubildung von Glycogen stattzufinden, wie aus

den Versuchen von Frentzel und Vogelius hervorgeht. Kein Wunder also, dass der Warmblüterorganismus im Gegensatz zu dem Kaltblüterorganismus, wenn er durch eingreifende Operationen seines Glycogens beraubt ist, mit allen Kräften aus jeder dargereichten Nahrung neues Glycogen zu bilden sucht.

Ausser dem Stoffwechselunterschiede zwischen Warm- und Kaltblüter lässt sich vielleicht auch folgender Einwand gegen die Froschversuche erheben: Bei normaler Fütterung stellt sich jedes Thier auf einen bestimmten Glycogengehalt ein, der ja bei Kohlehydratfütterung ein recht hoher, bei Eiweissfütterung ein geringerer, bei Fettfütterung ein minimaler ist. Wird über ein gewisses Maass hinaus Kohlehydrat zugeführt, so wird der Ueberschuss nicht mehr als Glycogen abgelagert, sondern in Fett verwandelt. Man darf demzufolge nach einer Fütterung, welche Glycogen bilden kann, nur dann auf eine erheblichere Glycogenablagerung rechnen, wenn der Körper vorher glycogenfrei bzw. arm ist. Dies trifft nun keineswegs bei den Froschversuchen zu: im Gegentheile, die verwandten Frösche zeichneten sich durch einen verhältnissmässig recht hohen Glycogengehalt aus.

Aus den mitgetheilten Versuchen scheint sogar hervorzugehen, dass die kohlehydratfreien Eiweisskörper beim Warmblüter bessere Glycogenbildner sind, als das Ovalbumin. Sollte sich dieses in weiteren Versuchen bestätigen, so würde dies darauf hindeuten, dass das aus dem Ovalbumin durch eingreifende chemische Processe zu gewinnende Amidokohlehydrat im Thierkörper nicht als Kohlehydrat Verwendung finden kann.

Bei der Annahme, dass das im Eiweisse steckende Kohlehydrat thatsächlich Chitosamin ist, erscheint dieses Ergebniss sehr natürlich: Denn Versuche, welche mit Chitose angestellt wurden, ergaben in Uebereinstimmung mit diesem Resultate, dass dieses Kohlehydrat den Körper grossen Theils unverändert passirt (Offer und Fränkel) und dass nach Verfütterung dieses Kohlehydrates kein Glycogenansatz zu erzielen ist (Fabian).

Aber allerdings muss hier nochmals betont werden, dass man nur mit äusserster Vorsicht derartige Vergleiche zwischen

anstehen darf, wenn nämlich die Versuchsthiere zu **grossen** und theilweise unvermeidliche sind: die Individualität der **einzelnen** Versuchsthiere, selbst bei völlig gleicher Versuchsanordnung, mag, wie Külz schon betont, bei der Glycogenbildung **eine** grosse Rolle spielen, so dass man zwei Thiere **niemals** als gleichwerthig in Bezug auf die Glycogenbildung ansehen **kann**. Dazu tritt das häufige Auftreten von Verdauungsstörungen gerade an den Ovalbuminversuchen. Sodann aber geht **aus den** klassischen Versuchen Pflüger's und seiner Schule **mit Bestimmtheit** hervor, dass alle unsere Methoden der **Glycogenbestimmung** mit grossen unkontrollirbaren Fehlern **behaftet** sind, so dass nur grosse Zahlenreihen mit constanten **grossen** Differenzen hier beweisen können.

Der Schluss, welchen wir aus den mitgetheilten Versuchen zu ziehen berechtigt sind, ist folgender: Nach Verfütterung kohlehydratfreier Eiweisskörper tritt beim Warmblüter ebenso eine Glycogenbildung auf, wie nach Verfütterung von Eiweisskörpern, welche eine Kohlehydratgruppe enthalten.

Dieses Versuchsergebniss deckt sich gut mit dem **in** unseren Phlorhizinversuchen gewonnenen Resultat, wo ja auch ein Einfluss der im Eiweiss steckenden Kohlehydratgruppe auf die Zuckerbildung im Organismus nicht nachzuweisen war. Das Dunkel, welches über die Art der Kohlehydratbildung aus Eiweiss im thierischen Organismus bisher schwebte, ist also in keiner Weise durch die chemische Forschung gelichtet worden.

Herrn Prof. Zuntz meinen herzlichsten Dank für seine thatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit auszusprechen, ist mir eine angenehme Pflicht.

---

### Litteratur.

- Blumenthal: Ueber den Stand der Frage der Zuckerbildung aus Eiweisskörpern. Deutsche medicinische Wochenschrift, 1889 Nr. 49/50.  
Pavy: Die Physiologie der Kohlehydrate, 1895.  
Blumenthal und P. Mayer: Berichte der chemischen Gesellschaft, 2. Februar 1899. 32, 274.

- Ludgowski:** Pflüger's Archiv, Bd. 14, S. 274.  
**v. Mering:** Pflüger's Archiv, Bd. 14, S. 274.  
**Zeitschrift für klinische Medicin**, Bd. XVI.  
**Schöndorff:** Pflüger's Archiv, 1899.  
**Minkowski:** Zeitschrift für experimentelle Pathologie und Therapie, 1893.  
**Biedl und Kolisch:** Congress für innere Medicin, 1900.  
**Zuntz:** Verhandlung der physiologischen Gesellschaft zu Berlin. 5. Juli 1895.  
**Pflüger:** Pflüger's Archiv, 1890 u. Folg.  
**J. Nerking:** Pflüger's Archiv, 1900.  
**R. Cohn:** Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XXVIII, 1899.  
**Halsey:** Gesellsch. für Beförderung d. ges. Naturw., Marburg, Mai 1899.  
**Lüthje:** Zeitschrift für klinische Medicin, Bd. 39.  
**Külz:** Festschrift für Carl Ludwig.  
**J. Athanasiu:** Pflüger's Archiv, 1899.  
**J. Frentzel:** Pflüger's Archiv, 1894.  
**Röhmman:** Pflüger's Archiv, Bd. 89.  
**Offer und Fränkel:** Centralblatt für Physiologie, Bd. 13.  
**E. Fabian:** Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XXVII.
-

# Eine neue Methode zur Bestimmung der Harnstoffe im Harne.

Von

Otto Folin.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des «Mc Lean Hospital» für Irrenkranke,  
Waverley, Mass. U. S. A.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Mai 1901.)

---

Da ich beabsichtigte, einige Stoffwechseluntersuchungen bei Irrenkranken anzustellen, habe ich Versuche unternommen, um eine Harnstoffbestimmungsmethode zu finden, die *einfacher* als die gebräuchlichen Methoden sein sollte, ohne diesen aber an Genauigkeit nachzustehen. Die zuverlässigen Verfahren zur Harnstoffbestimmung beruhen alle auf der hydrolytischen Spaltung des Harnstoffs in Kohlensäure und Ammoniak und der nachherigen Abdestillirung und Titrirung des letzteren. Aber trotz der ausserordentlichen Leichtigkeit, mit der diese Spaltung vor sich geht, ist dieselbe bloss eine theilweise und kann nur dann vollständig bewirkt werden, wenn die Zersetzung mehrere Stunden anhält. So fand vor Kurzem Pfaundler<sup>1)</sup> das 24stündige Kochen des Harns mit mehreren Volumina concentrirter Salzsäure ungenügend, um den im Harne enthaltenen Harnstoff zu zersetzen. Auch bei der Mörner-Sjöquist'schen und der Bunsen-Pflüger'schen bezw. der Pflüger-Gumlich'schen Methode der Harnstoffbestimmung im Harne wird 6—8stündiges Kochen mit grösseren Mengen 25%iger Natronlauge oder 3stündiges Erhitzen auf 230—260° mit 10 g Phosphorsäure benutzt, um etwa 0,1 g Harnstoff zu zersetzen.<sup>2)</sup> In der jüngst erschienenen Arbeit von Krüger

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 76.

2) Die Anwendung des Kjeldahl'schen Verfahrens dürfte wohl für die reine Harnstoffbestimmung nicht brauchbar sein. Vide Salaskin und Zaleski, diese Zeitschrift, Bd. XXVIII, S. 73.

und Schmidt<sup>1)</sup> wird 3—4stündiges Erhitzen auf 160—180° mit 50%iger Schwefelsäure benützt, um den Harnstoff in Ammonsalze umzuwandeln. Nun bewirkt allerdings ein kurzes Ueberhitzen von Harnstoff mit Wasser allein bezw. mit verdünnten Säuren oder Alkalien nach den Angaben mehrerer Forscher die Spaltung des Harnstoffs ebenso vollständig wie die längere Einwirkung von kochenden concentrirten Laugen oder Säuren; doch ist wohl auch dieses Verfahren noch zu umständlich, um sich für klinische Zwecke allgemein einzubürgern.<sup>2)</sup>

Ein bequemes und zugleich kurzes Verfahren, die Spaltung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlensäure zu erreichen, ist mir in folgender einfacher Weise gelungen:

Krystallisirtes Magnesiumchlorid,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , schmilzt in seinem Krystallwasser bei 112—115° und die so erhaltene Lösung hat einen Siedepunkt von ca. 160°. Eine solche siedende Lösung bewirkt die quantitative Spaltung des Harnstoffs binnen einer halben Stunde. Das Experiment wird in folgender Weise ausgeführt: 3 ccm. Harnstofflösung wird in einer Erlenmeyer-Flasche von 200 ccm. Inhalt abgemessen; dieser wird 2 ccm. concentrirte Salzsäure (specifisches Gewicht 1,140) und 20 g Magnesiumchlorid zugesetzt. Ein Rückflussrohr von 10 mm. Innendurchmesser und 200 mm. Länge wird durch einen gut passenden Kork in die Flasche hineingesetzt, um einen Theil der Salzsäure bei dem Kochen zurückzuhalten. (Dieses kurze Rückflussrohr ist ganz unentbehrlich, da ohne dasselbe alle Salzsäure entweicht, das Magnesiumchlorid sich zersetzt und die Lösung alkalisch wird.) Die Mischung von Harnstofflösung, Salzsäure und Magnesiumchlorid wird nun für etwa

---

1) Die Bestimmung des Amidosäurenstickstoffes im Harn. Diese Zeitschrift, Bd. XXXI, S. 560.

2) Es sei mir übrigens gestattet, hier zu bemerken, dass die Methode von Cazeneuve und Hugounencq (vide Neubauer's und Vogel's Harnanalyse, 10. Aufl., S. 813) kaum genaue Resultate liefern kann, denn das Verfahren, den Harn durch Thierkohle neutral zu machen, bewirkt einen merklichen Verlust an Harnstoff, wie ich bei Anwendung reiner Harnstofflösungen gefunden habe.

Wasser zu erhalten. Man erreicht den Zeitpunkt, in dem dies erreicht ist, daran, dass die zurückfliessenden Tropfen von Wasser und Salzsäure ein deutliches Zischen bewirken, ganz wie wenn man Tropfen von concentrirter Schwefelsäure in warmes Wasser einfliessen lässt. Tritt dieses ein, so wird die Flamme kleiner gemacht und das Kochen in mässigerem Tempo für etwa 25—30 Minuten fortgesetzt. Die Reaction ist nun beendet. Ohne die Mischung abkühlen zu lassen, spült man nun vorsichtig Wasser (zuerst tropfenweise) durch das Glasrohr in die Flasche hinein. Man kann selbstverständlich auch den Inhalt der Flasche zuerst etwas abkühlen lassen. Ich habe es aber immer zweckmässiger gefunden, die heisse Mischung sogleich mit Wasser zu verdünnen, um das Ausfallen festen Magnesiumchlorids zu verhindern. Die so erhaltene Lösung wird in einen Literkolben gespült, mit Wasser bis zu etwa 500 ccm. verdünnt, eine Messerspitze voll Talcumpulver und 7—8 ccm. 20%iger Natronlauge zugesetzt. Das Ammoniak wird in bekannter Weise abdestillirt, in Zehntelnormalsäure aufgefangen und titrimetrisch bestimmt.

Es mag auffallend erscheinen, dass nur so geringe Mengen Natronlauge zugesetzt werden, um das Ammoniak auszutreiben, doch haben grössere Mengen den Nachtheil, dass sie einen grösseren Ueberschuss des schwerlöslichen Magnesiumhydrats ausfallen, wodurch dann das Kochen in Folge des Schäumens sehr erschwert wird, ohne dass die Austreibung des Ammoniaks schneller vor sich ginge. Das quantitative Abdestilliren des Ammoniaks bei Anwesenheit grösserer Mengen von Magnesiumchlorid geht übrigens immer etwas langsam.<sup>1)</sup> Eine Stunde bis 70 Minuten genügt aber immer, um alles Ammoniak abzutreiben.<sup>2)</sup> Da das Destillat immer bedeutende Mengen

---

<sup>1)</sup> T. Schlösing, Compt. rend., Bd. 103, S. 227—230.

<sup>2)</sup> Um dieses Abdestilliren etwas abzukürzen, könnte man wohl auch Calciumchlorid statt Magnesiumchlorid zur Zersetzung des Harnstoffs benutzen, doch scheint mir das etwas kürzere Kochen (15—20 Minuten) nicht Grund genug zu sein, um letzteres dem Magnesiumchlorid vorzuziehen.

Kohlensäure enthält, muss dasselbe vor der Titrirung aufgeköcht und dann abgekühlt werden.

Das Magnesiumchlorid des Handels ist nie ammoniakfrei und die Menge des Ammoniaks in 20 g des angewandten Salzes muss gesondert bestimmt werden.<sup>1)</sup>

Der in den folgenden Versuchen angewandte Harnstoff war dreimal durch Alkohol umkrystallisirt, dann einmal aus Alkohol durch Aether gefällt und gewaschen, darauf einige Stunden an der Luft getrocknet und wurde schliesslich im Exsiccator über Schwefelsäure ein bis zwei Wochen aufbewahrt. Die Lösungen waren immer neutral gegen Lakmus wie auch gegen Rosolsäurelösungen.

Harnstofflösung I, 2,475 g Harnstoff in 100 ccm. enthaltend.

3 ccm. dieser Lösung, wie oben behandelt, neutralisirte 28,1 ccm.  $n/10$   $H_2SO_4$ . 20 g des angewandten Magnesiumchlorids enthielt 3,4 ccm.  $n/10$   $NH_3$ .

28,1 ccm. — 3,4 ccm.  $n/10$   $NH_3$  = 24,7 ccm.  $n/10$   $NH_3$  = 2,47 % Harnstoff.<sup>2)</sup>

Harnstofflösung II, 2,015 g Harnstoff in 100 ccm. enthaltend.

3 ccm. ergab nach Abzug der Magnesiumchloridcorrectur 20,6 ccm.  $n/10$   $NH_3$  entsprechend 2,06 % Harnstoff. Das Laboratorium war am Tage dieses Versuches nicht ganz ammoniakfrei. Die Bestimmung, am folgenden Tage wiederholt, gab aus 3 ccm. Harnstofflösung 20,1 ccm.  $n/10$   $NH_3$  entsprechend 2,01 % Harnstoff.

Also wird Harnstoff glatt und vollständig nach dem obigen Verfahren in Kohlensäure und Ammoniak gespalten. Die Vollständigkeit der Reaction wurde weiter dadurch bestätigt, dass ein zweites Destillat, das durch erneutes Kochen

---

1) Ich habe wenigstens von der Firma Eimer und Amend aus New-York kein ammoniakfreies Magnesiumchlorid bekommen können. Die Menge des Ammoniaks ist ganz bedeutend, aber gleichmässig durch das Salz vertheilt, so dass ein paar Bestimmungen genügen, um die Grösse der anzuwendenden Correctur festzustellen.

2) Ich habe immer 3 ccm. Harnstofflösung bezw. Harn für jede Harnstoffbestimmung gebraucht. Um diese Quantität genau abmessen zu können, benutze ich 5 ccm.-Pipetten in  $1/10$  ccm. getheilt und mit Geissler'schen Glashähnen versehen. Wenn man 3 ccm. für die Bestimmung benutzt, entspricht jedem Cubikcentimeter verbrauchter Zehntelnormalsäure 3 mg oder genau 0,1 % Harnstoff.



Die oben beschriebene Methode der Harnstoffzersetzung kann ohne Weiteres mit den gebräuchlichen Harnstoffbestimmungsmethoden, wie der Mörner-Sjöquist'schen oder der Pflüger-Gumlich'schen, combinirt werden. Man braucht nur die den Harnstoff enthaltenden Filtrate in der Erlenmeyer-Flasche abzumessen, die überschüssigen Flüssigkeiten nach dem Ansäuern abzukochen und darnach ganz wie bei den Harnstofflösungen zu verfahren. Statt Aetheralkohol (nach Mörner und Sjöquist) oder Phosphorwolframsäure (nach Pflüger) kann man auch das Krüger-Wulff'sche Reagens (Kupfersulfat und Natriumbisulfit) benutzen, um den Harnstoff von den anderen Stickstoffverbindungen des Harns zu trennen. Ich habe indessen nur einen Versuch nach Krüger und Wulff und zwar mit reiner Harnstoff- und reiner Harnsäure gemacht:

40,3 mg. Harnsäure wurde mit Hülfe von 45 mg Lithiumcarbonat in 50 ccm. der obigen 2,015 %igen Harnstofflösung II gelöst. Die Harnsäure wurde dann nach Krüger<sup>1)</sup> durch Zusatz von 5 ccm. Natriumbisulfitlösung, 5 ccm. Kupfersulfatlösung und 2,5 ccm. Bariumchloridlösung gefällt. 4 ccm. des Filtrates entsprechend 3,2 ccm. Harnstofflösung wurde durch Kochen mit Magnesiumchlorid zersetzt und das gebildete Ammoniak abdestillirt. 21,1 ccm.  $n/_{10}$   $\text{NH}_3$  entsprechend 19,8 ccm.  $n/_{10}$   $\text{NH}_3$  für 3 ccm. Harnstofflösung wurde erhalten. 19,8 ccm.  $n/_{10}$   $\text{NH}_3$  entspricht 1,98% Harnstoff.

Bei Vergleichung mit den jetzt gebräuchlichen Methoden zur Zersetzung des Harnstoffs erschien diese Spaltung aber so glatt, dass man wohl hoffen durfte, den Harnstoff direkt im Harne, ohne vorherige Abtrennung anderer Stickstoffverbindungen, zersetzen und abdestilliren zu können. Ich habe mehrere Versuche hierüber gemacht und habe bis jetzt keine Harne gefunden, in denen die so erhaltenen Werthe nicht mit den aus den Mörner-Sjöquist'schen Filtraten erhaltenen Resultaten übereinstimmten. Eine weitere Reihe von Versuchen wurde angestellt, um dieses Verfahren auch mit dem Pflüger-Gumlich'schen Filtrate zu kontrolliren. Bisweilen, aber nicht immer waren dabei die Resultate übereinstimmend.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XX, S. 181.

Auf Grund meiner Untersuchungen über den Harnstoffgehalt der Phosphorwolframsäurefiltrate glaube ich mit allem Vorbehalte sagen zu dürfen, dass das in den letzten Jahren so viel benutzte Pflüger-Gumlich'sche Verfahren der Harnstoffbestimmung auf seine Genauigkeit bis jetzt nicht genügend geprüft worden ist. Mörner und Sjöquist haben in unzweideutiger Weise gezeigt, dass die ursprüngliche Pflüger'sche Methode in nicht verdünnten Harnen viel zu niedrige Resultate gibt.<sup>1)</sup> Die genannten zwei Forscher haben dieses Harnstoffdeficit lediglich durch die Herausfällung des Harnstoffs aus concentrirteren Harnen erklärt. Gumlich hat darauf Harn bis zum specifischen Gewicht 1,017 verdünnt und hat dann mit einem Phosphorwolframsäurepräparat anscheinend richtige Resultate erhalten. Doch gibt er selbst an, dass er drei verschiedene Phosphorwolframsäurepräparate zur Verfügung hatte, dass er aber nur mit einem von diesen zuverlässige Resultate erhielt. Mit den anderen zwei hat er Differenzen bis 25% erhalten. Gumlich hat leider nicht direkt angegeben, ob diese zwei unbrauchbaren Präparate zu hohe oder zu niedrige Werthe lieferten, aber aus dem Zusammenhang seiner Darstellung scheint es höchst wahrscheinlich, dass das letztere der Fall war.<sup>2)</sup> Wenn dem so ist, dann ist aber die Verschiedenheit der Präparate schwer zu erklären, denn man kann wohl kaum annehmen, dass die zwei unbrauchbaren Präparate etwas anders als Phosphorwolframsäure mit harnstofffällender Eigenschaft enthalten haben. Man könnte an die Zersetzung des Harnstoffes durch die Salzsäure und die Ausfällung des so abgespaltenen Ammoniaks durch die Phosphorwolframsäure denken. Berthelot und André<sup>3)</sup> haben ja angegeben, dass in einer 2%igen Harnstofflösung, die 3% HCl enthält, der Harnstoff durch 24stündiges Stehen in der Kälte bis zu 4% zersetzt wird. Diese Angaben Berthelot's habe ich indessen nicht bestätigen können. Berthelot bestimmte

---

1) Skand. Arch. f. Physiol., Bd. 2, S. 466.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XVII, S. 12.

3) Annales de chimie et de physique, Bd. [6] 11, S. 319—321. — Bulletin de la Société chimique, Bd. [2] 47, S. 840.

Ueberschuss von Magnesia. Eine einfachere Methode, um die Zersetzung des Harnstoffs durch verdünnte Säuren zu verfolgen, wäre wohl die direkte Titration der Salzsäureharnstofflösung mit Hilfe von Normalnatronlauge bei Anwendung von Methylorange als Indicator. Ich habe auf diese Weise die Angaben von Berthelot und André zu bestätigen versucht, habe aber keine nennenswerthe Zersetzung des Harnstoffs durch 2,32%ige Salzsäure nach 24stündigem Stehen nachweisen können. Auch mit salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäure habe ich den Versuch wiederholt, aber mit dem gleichen Resultate. Die Endreaction bei der Titrirung von phosphorwolframsäurehaltiger Salzsäure ist übrigens auch bei sehr sorgfältiger Arbeit zu unsicher, um kleine Verluste an Harnstoff nachweisen zu können. Nach vollendeter Titrirung habe ich daher das abgespaltene Ammoniak durch Destillation mit Magnesia bestimmt.<sup>1)</sup> Aber auch so habe ich die Angaben Berthelot's nicht bestätigen können. Präformirtes Ammoniak war nur spurenweise vorhanden.

Die von mir benutzte Phosphorwolframsäurelösung enthielt 100 g Phosphorwolframsäure und 100 ccm. Salzsäure (specifisches Gewicht 1,12) im Liter. Das Reagens erzeugte nach 24stündigem Stehen eine deutliche Fällung in 2%igen, nicht aber in 1%igen Harnstofflösungen. 15 ccm. einer Harnstofflösung, die 1,534 g Harnstoff in 100 ccm. enthielt, wurde durch Zusatz von 10 ccm. 0,85%iger Ammonchloridlösung also bis zu einem Harnstoffgehalt von 0,92% verdünnt. Nach Zusatz von 50 ccm. Phosphorwolframsäure und 24stündigem Stehen wurden 15 ccm. des vollständig klaren Filtrates entnommen, concentrirt, durch Kochen mit Magnesiumchlorid zersetzt und das Ammoniak abdestillirt. 13,9 ccm. n/10  $\text{NH}_3$ , entsprechend einem Harnstoffgehalt von 1,39%, wurden wiedergefunden. Ein zweiter Versuch gab 1,41% Harnstoff. Ein Verlust also von etwa 8% des gesammten Harnstoffs aus

---

<sup>1)</sup> Siehe nächste Abhandlung über ein einfaches Verfahren zur Bestimmung des Ammoniaks im Harne.

angestellten Versuchen<sup>1)</sup> scheint es mir zweifelhaft, ob man durch Verdünnung von Harnstofflösungen bezw. Harnen die Ausfällung des Harnstoffs durch Phosphorwolframsäure bei Anwesenheit anderer, durch Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoffverbindungen vollständig vermeiden kann.

Bei Vergleichung mit der Mörner-Sjöquist'schen Methode zur Bestimmung des Harnstoffs habe ich keine Schwierigkeiten gefunden, sondern stets gut übereinstimmende Werthe erhalten. Bei der Handhabung dieser Methode der Harnstoffisolirung schien mir eine kleine Abänderung vortheilhaft in der Weise, dass stets 9 ccm. Harn mit 9 ccm. alkalischer Baryumchloridlösung und 207 ccm. der Aetheralkoholmischung für jeden Versuch benutzt wurden. 75 ccm. des Filtrates entsprechen dann 3 ccm. Harn. In dieser Weise umgeht man das schwierige Auswaschen der Aetheralkoholfällung. Ueberdies hat man auch die Möglichkeit, weitere 75 ccm. des Filtrates für eine Parallelbestimmung zu erhalten. Ich habe auch unterlassen, den Aetheralkohol bei alkalischer Reaction abzdunsten, sondern habe sogleich etwas Salzsäure zugesetzt und den Aetheralkohol abgekocht. Dies erschien zweckmässiger, weil ohnehin später das präformirte Ammoniak zwecks Vergleichung mit der Phosphorwolframsäuremethode zu bestimmen war.

Als Beispiele mögen die folgenden Harnstoffbestimmungen dienen:

#### Harn I.

a) 3 ccm. Harn, mit 20 g Magnesiumchlorid und 2 ccm. HCl erhitzt und destillirt, ergab 18,2 ccm.  $n_{10} \text{ NH}_3$ .

Präformirtes Ammoniak, gesondert bestimmt, entsprach für 3 ccm. Harn 0,63 ccm.  $n_{10} \text{ NH}_3$ .

Das Harnstoffammoniak ist demnach 18,2 ccm. — 0,63 ccm.  $n_{10} \text{ NH}_3$  = 17,57 ccm.  $n_{10} \text{ NH}_3$  = 1,75 % Harnstoff.

b) 75 ccm. eines Mörner-Sjöquist'schen Filtrats, entsprechend 3 ccm. desselben Harns, ergab nach Abkochen des Aetheralkohols und nachheriger Behandlung mit Magnesiumchlorid etc. 17,85 ccm.  $n_{10} \text{ NH}_3$ .

---

1) Siehe unter Harn V, folgende Seite.

## Harn II.

a) 3 ccm. Harn, mit Magnesiumchlorid etc. direkt behandelt, ergab 14,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Präformirtes Ammoniak = 0,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak ist demnach 14,7 ccm. — 0,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 14 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 1,40% Harnstoff.

b) 12 ccm. Phosphorwolframsäurefiltrat, entsprechend 3 ccm. desselben Harns, abgekocht und mit Magnesiumchlorid etc. behandelt, ergab 14,2 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , entsprechend 1,42% Harnstoff.

## Harn III.

a) 3 ccm. Harn, mit Magnesiumchlorid etc. behandelt, ergab 21,2 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Präformirtes Ammoniak = 0,75 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak entspricht demnach 21,2 ccm. — 0,75 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 20,45 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 2,045% Harnstoff.

b) 75 ccm. eines Mörner-Sjöquist'schen Filtrats, entsprechend 3 ccm. desselben Harns, ergab nach Abkochen des Aetheralkohols und nachheriger Behandlung mit Magnesiumchlorid etc., 21,5 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak ist daher 21,5 ccm. — 0,75 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 20,75 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 2,075% Harnstoff.

## Harn IV.

a) 3 ccm. Harn, nach Magnesiumchloridbehandlung etc., ergab 19,9 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das präformirte Ammoniak = 0,8 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak entspricht demnach 19,9 ccm. — 0,8 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 19,1 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 1,91% Harnstoff.

b) 75 ccm. eines Mörner-Sjöquist'schen Filtrats, 3 ccm. Harn entsprechend, ergab 20,5 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak ist demnach 20,5 ccm. — 0,8 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 19,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 1,91% Harnstoff.

c) 15 ccm. eines Phosphorwolframsäurefiltrats, entsprechend 3 ccm. desselben Harns, ergab 19,1 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 1,91% Harnstoff.

## Harn V (Pneumonie, eiweisshaltig).

a) 3 ccm. Harn nach der Magnesiumchloridbehandlung ergab 30,2 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das präformirte Ammoniak = 1,4 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak entspricht demnach 30,2 ccm. — 1,4 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 28,8 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 2,88% Harnstoff.

a1) 3 ccm. desselben Harns, nach Entfernung des Eiweisses (durch Kochen mit etwas Essigsäure), ergab nach der Magnesiumchloridbehandlung 29,9 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das Harnstoffammoniak entspricht demnach 29,9 ccm. — 1,4 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 28,5 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  = 2,85% Harnstoff.

b) 75 ccm. eines Mörner-Sjöquist'schen Filtrats, entsprechend 3 ccm. Harn, ergab 29,9 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , entsprechend also 2,85% Harnstoff.

c) 15 ccm. Phosphorwolframsäurefiltrat, entsprechend 3 ccm. Harn, ergab 25,8 ccm.  $n_{10}$   $\text{NH}_3$  = 2,58 % Harnstoff.

Ein zweiter Versuch ergab 2,575 % Harnstoff.

Bei den beiden letzten Versuchen war der Harn vor dem Phosphorwolframsäurezusatz mit 2 Volumina Wasser, also bis zu etwa 0,9%igem Harnstoffgehalt, verdünnt. Ein dritter Versuch wurde darauf in der Weise gemacht, dass 12,5 ccm. Harn mit 4 Volumina (50 ccm.) Wasser vor dem Phosphorwolframsäurezusatz (25 ccm.) verdünnt wurde. Nach 22stündigem Stehen wurden drei Proben von je 21 ccm. (entsprechend 3 ccm. Harn) bis zu etwa 5 ccm. eingedampft und darauf in gewöhnlicher Weise mit Magnesiumchlorid und Salzsäure gekocht und das Ammoniak abdestillirt. Es wurden erhalten 27 ccm., 26,8 ccm. und 27,1 ccm.  $n_{10}$   $\text{NH}_3$ , entsprechend einem Harnstoffgehalt von 2,70%.

Hier war also ein Harn, bei dem ich den Harnstoff von den anderen Stickstoffverbindungen durch Phosphorwolframsäure nicht trennen konnte. Verschiedene andere Fieberharne, besonders aber Pneumonieharne, die Eiweiss und grössere Mengen Ammoniak enthielten, haben dieselben Resultate ergeben.

Die Ergebnisse meiner Untersuchung sind daher folgende:

1. Krystallisirtes Magnesiumchlorid,  $\text{MgCl}_2$ , 6  $\text{H}_2\text{O}$ , siedet in seinem Krystallwasser bei etwa 160°. Harnstoff wird durch eine solche siedende Magnesiumchloridlösung binnen einer halben Stunde quantitativ in Ammoniak und Kohlensäure gespalten. Diese Methode der Zersetzung des Harnstoffs eignet sich gut zu Harnstoffbestimmungen. Man braucht nur die Harnstofflösung bzw. die aus Harnen erhaltenen Harnstofffiltrate bei saurer Reaction bis zu etwa 5 ccm. einzudampfen, Magnesiumchlorid und etwas Salzsäure zuzusetzen, noch etwas mehr Wasser durch Eindampfen zu entfernen und schliesslich für eine weitere halbe Stunde im Sieden zu erhalten. Ein geringer Theil des Magnesiumchlorids wird dann durch Zusatz von etwas Natronlauge in Magnesiumhydrat umgewandelt und das Ammoniak abdestillirt.

2. Um Filtrate aus dem Harn zu bekommen, die allen Harnstoff enthalten, eignet sich die Mörner-Sjöquist'sche

Früher-Grünlich, denn die letztere hat bisweilen Harnstoff, auch wenn der Harn bis zu 0,9%igem Harnstoffgehalt verdünnt worden ist.

3. Halbstündiges Kochen mit salzsäurehaltigem Magnesiumchlorid sowie die nachherige Destillation mit Magnesia sind verhältnissmässig sehr schwache Eingriffe. Daher kann man auch allem Anscheine nach Harn direkt ohne vorherige Abtrennung anderer Stickstoffverbindungen in obiger Weise behandeln und zuverlässige Werthe für deren Harnstoffgehalt erzielen.

Diese einfache Methode der Harnstoffbestimmung wird dann in folgender Weise ausgeführt: 3 ccm. Harn, 20 g Magnesiumchlorid und 2 ccm. concentrirter Salzsäure werden in einer Erlenmeyer-Flasche (200 ccm. Inhalt) unter Benutzung eines kurzen Rückflussrohrs (200 mm.  $\times$  10 mm.) gekocht, bis die aus dem Rohr zurückfliessenden Tropfen unter zischen-dem Geräusch in die Mischung, welche sich in der Flasche befindet, zurückfallen. Das Kochen wird dann in mässiger Weise 25 bis 30 Minuten fortgesetzt; mit Wasser vorsichtig verdünnt, in einen Literkolben gespült und das Ammoniak nach Zusatz von etwa 7 ccm. 20%iger Natronlauge abdestillirt. Gewöhnlich müssen etwa 350 ccm. abdestillirt werden (was etwa 60 Minuten in Anspruch nimmt), bevor alles Ammoniak entfernt ist. Das Destillat wird aufgeköcht, abgekühlt und titirt. Jedem im Destillate enthaltenen Cubikcentimeter  $n/10$   $\text{NH}_3$  entspricht 3 mg oder 0,1% Harnstoff. Die Correcturen für den Ammoniakgehalt des angewandten Magnesiumchlorids, sowie für das präformirte Ammoniak des Harns, müssen gesondert ermittelt werden.

Waverley, Mass. U. S. A., April, 1901.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des «Mc. Lean Hospital» für Irrenkranke,  
Waverley, Mass. U. S. A.)

(Der Redaction zugegangen am 4. Mai 1901.)

Nach der Methode von Schlösing sind mehrere Tage nöthig, um eine Ammoniakbestimmung im Harn zu machen. Die Methode ist wohl auch etwas unsicher, denn erstens weiss man nicht, wie lange die Harnprobe stehen muss, um alles Ammoniak abdunsten zu lassen, und zweitens wird Harnstoff in wässriger Lösung, wenn auch sehr langsam, zersetzt.

Das folgende einfache Verfahren scheint nun ganz zuverlässige Werthe für den Ammoniakgehalt in Harnstofflösungen bezw. in Harnen zu geben:

Die Harnstofflösung, bezw. der Harn, wird mit 400 bis 500 ccm. Wasser verdünnt und mit gebrannter Magnesia bezw. mit Kalkwasser eine bestimmte Zeit gekocht, um alles präformirte Ammoniak abzutreiben. 45 Minuten, die Zeit des Anwärmens nicht mitberechnet, genügen, um dieses Ziel zu erreichen. Darauf öffnet man (während die zum Kochen benutzte Gasflamme unverändert bleibt) den Destillationskolben und fügt eine dem ersten Destillat annähernd gleiche Menge kochendes Wasser hinzu. Das Kochen wird darauf noch 45 Minuten fortgesetzt und dieses zweite Destillat wie das erste in einer mit Zehntelnormalsäure beschickten Vorlage aufgefangen.

Die Bestimmung des präformirten Ammoniaks durch Titrirung dieser beiden Destillate beruht auf der Annahme, dass die Zersetzung des Harnstoffs (die jedenfalls ganz klein ist) gleichmässig vor sich geht und dass daher das erste Destillat eine aus zersetztem Harnstoff stammende Menge Ammoniak enthält, die dem Ammoniakgehalt des zweiten Destillates gleich ist. Ist diese Annahme aber erlaubt, so



ziehen, um die Menge des präformirten Ammoniaks zu finden. Folgender Versuch zeigt die Richtigkeit dieser Voraussetzung.

10 ccm. Harnstofflösung (1,538%) und 5 ccm. einer Ammonchloridlösung wurden in einem Literkolben auf etwa 450 ccm. verdünnt. Es wurde gebrannte Magnesia (0,5 g) zugesetzt und die Mischung zweimal in oben genannter Weise destillirt. Das erste Destillat enthielt 9,9 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , das zweite 1,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das aus dem Ammonchlorid stammende Ammoniak sollte demnach 8,2 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  gleich sein. 5 ccm. Ammonchloridlösung wurden darauf ohne Harnstoffzusatz bis auf etwa 450 ccm. verdünnt und dessen Ammoniak durch Kochen mit Magnesia abgetrieben. Das in dieser Weise erhaltene Ammoniak entsprach 8,1 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ .

Ein weiterer Beweis für die principielle Richtigkeit dieses Verfahrens der Ammoniakbestimmung ist die Thatsache, dass der Ammoniakgehalt einer dritten und vierten Destillation bei genauem Arbeiten dem Ammoniakgehalt des zweiten Destillates gleich ist. Dieser Befund, wie das ganze Princip dieser Ammoniakbestimmungsmethode ist übrigens schon vor 14 Jahren von Berthelot, der die Methode in ähnlicher Weise anwandte, beschrieben worden. Doch waren mir die Angaben Berthelot's nicht bekannt. Ich habe sie erst nachher zufälliger Weise gefunden, als ich Gelegenheit hatte, Berthelot's Angaben über die Zersetzlichkeit des Harnstoffs durch verdünnte Salzsäure nachzusehen.<sup>1)</sup> Uebrigens ist meines Wissens das Princip noch nie benutzt worden, um Ammoniakbestimmungen im Harne zu machen.

Ein weiterer Versuch, um die Zuverlässigkeit der Methode zu prüfen, wurde in folgender Weise angestellt:

10 ccm. Harn, auf 450 ccm. verdünnt, wurden zweimal 45 Minuten lang, wie oben, destillirt. Das erste Destillat enthielt 4,5 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , das zweite 2,2 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das präformirte Ammoniak entsprach demnach 4,5 ccm. weniger,

<sup>1)</sup> Siehe meine vorhergehende Abhandlung über «Eine neue Methode zur Bestimmung des Harnstoffs im Harne».

2,2 ccm. oder 2,3 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . 10 ccm. desselben Harns und 5 ccm. des obigen Ammonchlorids wurden zweimal 45 Minuten lang destillirt. Das erste Destillat enthielt 12,6 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , das zweite 2,35 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Das aus dem Ammonchlorid herstammende Ammoniak ist demnach die Differenz zwischen 12,6 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  und der Summe von 2,35 ccm. + 2,3 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  (das im Harn präexistirende + das aus zersetzten Harnstoff erhaltene Ammoniak). Also wurden wiedergefunden 7,95 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  anstatt 8,1 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , die thatsächlich dem Harne zugesetzt worden waren. Der in obigen Versuchen benutzte Harn wurde auf seinen Ammoniakgehalt auch nach Schlösing untersucht. Nach 6 tägigem Stehen fanden sich darin 2,4 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , also nur 0,1 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  mehr, als nach dem obigen Destillationsversuch. Ein anderer Versuch nach Schlösing ergab aber nach 10 tägigem Stehen 2,95 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ .

Ein eiweisshaltiger Harn, der auch zu Harnstoffbestimmungen angewandt wurde (siehe vorstehende Abhandlung Harn V), wurde auf seinen Ammoniakgehalt in folgender Weise geprüft:

In einer Probe wurde das Eiweiss durch kurzes Erhitzen mit etwas Essigsäure entfernt. 20 ccm. des Filtrates wurden zweimal destillirt. Es ergaben sich 17,3 ccm. und 7,8 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , entsprechend einem Ammoniakgehalt von 9,5 ccm.,  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Ein zweites Filtrat (20 ccm.) wurde viermal je 45 Minuten lang destillirt. Es wurden erhalten: 18,1 ccm., 8,8 ccm., 8,85 ccm. und 8,8 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Dieser Versuch ergab also einen Ammoniakgehalt des Harns von 9,3 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Derselbe Harn wurde auch nach vorheriger Abtrennung des Eiweisses zu Ammoniakbestimmungen benutzt. Aus 20 ccm. Harn wurden dabei erhalten 16,9 ccm., 7,8 ccm., 7,65 ccm. und 7,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ , entsprechend einem Ammoniakgehalt von 9,2 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$ . Nach Schlösing (7 tägigem Stehen) wurden aber 11,7 ccm.  $n/10$   $\text{NH}_3$  aus 20 ccm. Harn erhalten. Ein Theil dieses Ammoniaks ist wohl aus dem bei diesem Versuche nicht entfernten Eiweiss entstanden.

Waverley Mass. U. S. A., April 1901.

# Ueber eine bisher unbekannte reducirende Substanz des Blutes.

Von

Dr. med. Paul Mayer (Berlin-Karlsbad).

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des pathologischen Instituts zu Berlin.)

(Der Redaction zugegangen am 13. Mai 1901.)

---

Durch die Arbeiten von Magendie, Claude Bernard und anderen Forschern ist es festgestellt, dass das Blut eine reducirende, mit Hefe vergärbare Substanz enthält, welche die Ebene des polarisirten Lichtes nach rechts dreht; und seit Langem ist man gewöhnt, diesen Körper als Traubenzucker anzusprechen. Die fortschreitende Entwicklung der Kohlenhydratchemie hat uns jedoch gelehrt, dass die erwähnten Eigenschaften für die Identificirung eines Körpers als Traubenzucker nicht genügen, und so ist der exacte Beweis, dass die Glucose ein normaler Bestandtheil des Blutes ist, eigentlich erst durch Pickardt<sup>1)</sup> erbracht worden, der aus dem Blute das Phenylsazon des Traubenzuckers dargestellt hat.

In Berücksichtigung des Umstandes, dass durch die titrimetrische Bestimmung des Blutzuckers regelmässig höhere Werthe als durch die Polarisation gefunden werden, haben einzelne Autoren die Vermuthung ausgesprochen, dass das Blut ausser dem Traubenzucker noch andere reducirende Substanzen enthalten müsse, die von einigen als Kreatinin, von anderen als Harnsäure aufgefasst worden sind. Die bei weitem bemerkenswerthesten Untersuchungen über diese Frage hat Otto<sup>2)</sup> ausgeführt, der durch genaue quantitative Bestimmungen fest-

---

<sup>1)</sup> M. Pickardt, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XVII, 1892; s. a. Miura, Zeitschr. f. Biol., 32, 1895.

<sup>2)</sup> Otto, Pflüger's Archiv, Bd. 35, 1885.

gestellt hat, dass im Blute ausser der gährungsfähigen Dextrose noch eine gährungsunfähige reducirende Substanz vorkommt, über deren chemische Natur der Autor, wie er selbst hervorhebt, nichts Sicheres auszusagen wagt.

Merkwürdiger Weise haben die Ergebnisse Otto's keinen nennenswerthen Einfluss auf die Lehre von dem Zuckergehalt des Blutes gehabt, wohl hauptsächlich deshalb, weil seit der Entdeckung des Jecorins durch Drechsel<sup>1)</sup> und dem Auffinden dieses Körpers im Blute durch Baldi<sup>2)</sup> alle Autoren, die sich mit den reducirenden Stoffen des Blutes beschäftigt haben, ihr Interesse fast lediglich dem Jecorin zugewendet haben.

Gestützt auf die Thatsache, dass das Jecorin eine reducirende und in Aether lösliche Substanz ist, hat zuerst Jacobsen<sup>3)</sup> die gährungsunfähige reducirende Substanz des Blutes für Jecorin erklärt, weil dieselbe in den Aetherextract des Blutes übergeht; und die weiteren Forschungen dieses Autors gehen von der Voraussetzung aus, dass alle ätherlöslichen reducirenden Substanzen des Blutes Jecorin sein müssen.

Obwohl nun die chemische Constitution des Jecorins noch keineswegs völlig aufgeklärt ist, obwohl die Identität des Blutjecorins mit dem Drechsel'schen Leberjecorin durchaus noch nicht sicher feststeht, und wir nicht einmal über die Natur des aus den verschiedenen jecorinartigen Substanzen abzuspaltenden Kohlehydrates genügend orientirt sind, haben doch alle folgenden Untersucher Henriques, Bing, Kolisch und Steyskal<sup>4)</sup> die Voraussetzung Jacobsen's als Thatsache hingenommen, ohne mit der Möglichkeit zu rechnen, dass im Blute noch andere reducirende Substanzen vorhanden sein können, die gleichfalls in Aether löslich, aber nicht mit dem Jecorin identisch sind. Enthält aber das Blut solche Körper,

---

<sup>1)</sup> Drechsel, Ber. d. sächs. Ges. d. Wissensch., 1886, S. 44.

<sup>2)</sup> Baldi, Du Bois-Reymond's Archiv, physiol. Abth., 1887, Suppl. S. 100.

<sup>3)</sup> Jacobsen, Centralbl. f. Physiol., 1892, Heft 13.

<sup>4)</sup> V. Henriques, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIII, 1895. — Bing, Centralbl. f. Physiol., 1898, Heft 12. — Kolisch u. Steyskal, Wiener klin. Wochenschr., 1897, S. 1101—1103, und Wiener klin. Wochenschrift, 1898, S. 135.

waren; und so finden wir denn in den verschiedenen Blutjecorinarbeiten eine Reihe von Befunden, deren Deutung auf Schwierigkeiten stösst, welche zum Theil nur durch die Formulirung recht unsicher begründeter Hypothesen umgangen werden.

Die wichtigsten Schlüsse, welche die genannten Autoren aus ihren Untersuchungen ziehen, sind die, dass das Jecorin des Blutes eine Verbindung von Lecithin und Glucose ist, und dass der Traubenzucker nur zum kleinsten Theil präformirt, vielmehr zum überwiegenden Antheil an Lecithin gebunden, eben als Jecorin, im Blute kreist.

Um zu zeigen, auf wie unsicheren Ergebnissen diese Schlussfolgerungen aufgebaut sind, möchte ich nur auf die letzte Arbeit von Bing<sup>1)</sup> aus dem Jahre 1899 hinweisen. Bing ist es gelungen, durch Zusammenbringen von Glycose und Lecithin Lecithinglycose, also nach der Vorstellung der Autoren Jecorin darzustellen. Da nun beim Eintrocknen einer alkoholischen Lösung von Zucker, die gleichzeitig Lecithin enthält, Lecithinzucker entsteht, so muss Bing selbst zugeben, dass bei der Verarbeitung eines alkoholischen Blutextractes die Möglichkeit einer Lecithinzuckerbildung gegeben ist, dass es daher gar nicht entschieden ist, ob das Jecorin wirklich im Blute präformirt ist oder nicht einfach ein Laboratoriumsprodukt darstellt.

Für diese letztere Möglichkeit sprechen jedenfalls Dialysirversuche, die Bing selbst angestellt hat, und die, sowie übrigens bereits frühere Versuche von Arthus,<sup>2)</sup> gezeigt haben, dass der Zucker aus dem Blut bis zum Gleichgewicht zwischen Innen- und Aussenflüssigkeit diffundiren kann. Schon früher war dieser von Arthus erhobene Befund gegen die von Schenk<sup>3)</sup> aufgestellte, später aber von ihm selbst widerrufenen Anschauung, dass der Zucker nicht frei gelöst, sondern an Eiweiss gebunden im Blute circulirt, ins Feld geführt worden.

---

1) Bing, Skandin. Archiv f. Physiologie, 1899, Nr. 9.

2) Arthus, nach Maly's Jahresbericht 1890.

3) Schenk, Pflüger's Archiv 46, 607.

Bing selbst betont nun zwar, dass das Ergebniss seiner Dialysirversuche nicht gut mit der Annahme einer Bindung des Zuckers vereinbar ist, hilft sich aber mit der Hypothese, dass bei diesem Diffusionsprocess möglicher Weise der Lecithinzucker in seine Componenten zerlegt wird.

Kolisch und Steyskal gehen in ihren Schlussfolgerungen noch weiter, indem sie gleichsam eine doppelte Bindung des Traubenzuckers im Blute annehmen. Da nämlich diese Forscher gefunden haben, dass dem Blute zugesetztes Jecorin nach dem Trocknen über Schwefelsäure durch Aether leicht extrahirbar ist, während das im Blute circulirende Jecorin nur dann vom Aether aufgenommen wird, wenn vorher die Eiweisskörper durch Alkohol gefällt werden, so folgern sie, dass das Jecorin nicht frei, sondern an Eiweiss gebunden im Blute kreist, und dass diese Eiweissverbindung erst durch die Wirkung des Alkohols gespalten wird. Diese Anschauung scheint mir schon im Hinblick auf die erwähnten Dialysirversuche nicht haltbar zu sein, ganz abgesehen davon, dass eine spaltende Wirkung des Alkohols auf Eiweissverbindungen bisher nicht als sicher erwiesen gilt. Allerdings hat Hoppe-Seyler seiner Zeit die Möglichkeit offen gelassen, dass das Vitellin des Eidotters eine durch Alkohol spaltbare Lecithinverbindung sei. Auch Pekelharing<sup>1)</sup> nimmt eine spaltende Wirkung des Alkohols auf das von ihm dargestellte Pepsin an, und in neuester Zeit haben sich Nencki und Sieber<sup>2)</sup> ebenfalls dahin ausgesprochen, dass das Waschen mit Alkohol zersetzend auf complicirte Eiweissverbindungen, wie das von ihnen erhaltene Pepsin, einwirkt.

So sehen wir denn, wie schwankend der Boden ist, auf dem sich unsere Vorstellungen über die Rolle des Jecorins im Blute bewegen, und ohne die Existenz des Jecorins im Blut irgendwie bezweifeln zu wollen, glaube ich doch, dass die bisherigen Untersuchungen nicht ausreichen, um sichere Schlüsse aus denselben ziehen zu können oder gar neue

---

1) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXII, S. 233.

2) Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXXII, S. 317.

Theorien über den Entstehungsmodus der pathologischen Glycosurien zu construiren.<sup>1)</sup>)

Bevor ich auf meine eigenen Untersuchungen eingehe, muss ich noch einer in jüngster Zeit erschienenen Arbeit von Pavy und Siau<sup>2)</sup> Erwähnung thun. Aus der übrigens schon von Anderen festgestellten Thatsache, dass nach der Einwirkung einer Mineralsäure das Reductionsvermögen des Blutes zunimmt, schliessen Pavy und Siau auf die Anwesenheit eines zweiten Kohlehydrates im Blut. Sie fanden nun bei der Osazondarstellung ausser dem typischen Glucosazon stets noch eine andere, erst beim Erkalten ausfallende Verbindung, die den Schmelzpunkt von 157—158° zeigte, und die sie deshalb als das Osazon der Isomaltose ansprechen. Lediglich auf Grund dieser Schmelzpunktsbestimmung halten die Autoren es für erwiesen, dass die Isomaltose ein normaler Bestandtheil des Blutes ist. Mir erscheint der Beweis hierfür keineswegs in sicherer Weise erbracht zu sein. Denn vor Allem geht es nicht an, allein aus der Schmelzpunktsbestimmung einer durch Trennung von einem anderen Osazon gewonnenen Phenylhydrazinverbindung bindende Schlüsse auf die Natur eines Kohlehydrates zu ziehen. Wer nur einige Erfahrungen auf diesem Gebiete besitzt, wird zugeben, dass man in der Deutung derartiger aus complicirten Gemischen erhaltenen Phenylhydrazinverbindungen ungemein vorsichtig sein muss; und dies gilt ganz besonders für eine Substanz wie die Isomaltose, deren natürliches Vorkommen überhaupt noch gar nicht so feststeht, wie vielfach angenommen wird. Zudem zeigt der Schmelzpunkt von 157—158° eine fast vollkommene Uebereinstimmung mit dem Schmelzpunkt der Pentosazone, und ich konnte in einer früheren Arbeit nachweisen,<sup>3)</sup> dass auch die Glucuronsäure eine Phenylhydrazinverbindung liefern kann, deren Schmelzpunkt bei 159—164° liegt. Aus diesen Gründen bedürfen auch die Angaben über das Vorkommen der Isomaltose im Blut einer erneuten Prüfung.

1) Kolisch, Verhandl. des Congr. f. inn. Med., 1900, S. 579.

2) Pavy u. Siau, The journal of Physiologie, XXVI, 3 u. 4, 1901.

3) P. Mayer, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXIX, 1900, Heft 1.

Pavy und Siau erachten allerdings nach ihren Untersuchungen das Vorkommen der Isomaltose im Blut für sicher bewiesen, weil sie auch aus dem Harn Phenylhydrazinverbindungen vom Schmelzpunkt  $157^{\circ}$  erhalten haben. Sehr bemerkenswerth erscheint die Angabe der Autoren, dass sie dieses Osazon am häufigsten aus diabetischen Harnen isoliren konnten, die nur noch Spuren von Zucker, dafür aber grosse Mengen von «Isomaltose» enthielten. Da ich in derartigen diabetischen Harnen wiederholt eine gesteigerte Glucuronsäureausscheidung constatirt habe,<sup>1)</sup> und da eine Phenylhydrazinverbindung der Glucuronsäure vom Schmelzpunkt  $159\text{--}164^{\circ}$  existirt, so ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, dass der Körper, den Pavy und Siau als Isomaltose angesprochen haben, Glucuronsäure ist, zumal sie in unbewusster Bestätigung meiner eigenen Angaben mittheilen, dass diese diabetischen Harnen nach dem Vergähren des Zuckers eine ausgesprochene Linksdrehung zeigen und eine deutliche Reduction, die nach dem Kochen mit Säure zunimmt. Es ist also sehr wohl möglich, dass auch das von Pavy und Siau aus dem Blute gewonnene Osazon eine Phenylhydrazinverbindung der Glucuronsäure gewesen ist.

Was nun endlich meine eigenen Untersuchungen anlangt, so knüpfen dieselben an die erwähnten Befunde von Otto an. Ich habe zunächst acht Versuche mit Kaninchen- und Rinderblut angestellt und in einem Falle auch menschliches, durch Aderlass gewonnenes Blut verarbeitet. Es wurden stets 100 bis 200 ccm. des frischen Blutes nach der Abeles'schen Methode enteiweissst, und die völlig eiweissfreien zuckerhaltigen Lösungen im Brutschrank bei  $34^{\circ}$  vergohren. In sechs Versuchen liess ich die Vergährung 12—15 Stunden andauern, nach welcher Zeit der Zucker, wie ich mich durch eine nochmalige Gährungsprobe überzeugt habe, stets vollkommen vergohren war, während ich in zwei Fällen die Vergährung auf 24 Stunden ausdehnte. In den ersten sechs Versuchen konnte ich nun ausnahmslos nach dem Vergähren des Zuckers ebenso

---

<sup>1)</sup> P. Mayer, Deutsche medic. Wochenschr., Nr. 16 u. 17, 1901.



wie Otto eine deutliche Reduction nachweisen. Die Lösungen gaben aber ausserdem regelmässig die Phloroglucinprobe und zum Theil allerdings erst nach genügender Concentration, eine mehr oder minder starke Orcinreaction. Da nun bekanntlich die Hefepartikel aus vergohrenen Flüssigkeiten sich nur schwer bis auf die letzten Spuren entfernen lassen, so war es denkbar, dass diese Reactionen durch Kohlenhydratbestandtheile der Hefe veranlasst waren, obwohl ich diese Fehlerquelle durch wiederholtes Filtriren und Absetzenlassen der Lösungen unter Benützung des besten Filtrirpapiers von vornherein ausschliessen bemüht war. Ich überzeugte mich jedoch durch in derselben Weise ausgeführte Kontrollversuche an vergohrenen Traubenzuckerlösungen, dass dieselben weder die Phloroglucin- noch die Orcinreaction geben, so dass der positive Ausfall dieser Proben auf im Blute selbst vorhandene Substanzen bezogen werden musste. Da die Phloroglucin- und Orcinprobe vor Allem den Pentosen und der Glucuronsäure zukommen,<sup>1)</sup> so war es sehr wahrscheinlich, dass die nach dem Vergähren des Zuckers noch vorhandene Reduction des Blutes durch Pentosen oder Glucuronsäure hervorgerufen wird.

Die polarimetrische Untersuchung der vergohrenen, sicherlich eiweissfreien Lösung ergab nun jedesmal eine deutliche Linksdrehung, die in einem Falle sogar 0,4%, auf Traubenzucker berechnet, betrug. In der Annahme, dass diese Linksdrehung durch eine gepaarte Glucuronsäure veranlasst war, erhitze ich die Flüssigkeiten während einer Stunde im Autoclaven mit so viel concentrirter Schwefelsäure, dass die Lösung einer 1%igen  $H_2SO_4$  Lösung entsprach. Der Erfolg dieser Operation war der, dass in allen sechs Fällen die Linksdrehung verschwand, während ich allerdings nur in einem Versuch eine schwache, aber unverkennbare Rechtsdrehung constatiren konnte. Der Umstand, dass es mir unter sechs Versuchen nur einmal gelang, durch die

---

1) Vor Kurzem hat Neuberg (Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXXI, Heft 5 u. 6, 1901) festgestellt, dass auch andere Substanzen aus der Reihe der Kohlehydrate diese Proben geben (Glycerose, Glycerinaldehyd, Formose, Aldehydschleimsäure etc.). Diese können jedoch hier kaum in Betracht kommen.

Spaltung mit Säure eine Rechtsdrehung hervorzurufen, konnte keineswegs gegen das Vorhandensein einer gepaarten Glucuronsäure sprechen; denn bekanntlich wird die Glucuronsäure in dem Maass, wie sie abgespalten, zum Theil wieder durch die Säure unter Furfurolbildung zersetzt, so dass es bei sehr geringen Mengen, um die es sich hier nur handeln konnte, lediglich von zufälligen Momenten abhängt, ob nach der Spaltung eine Rechtsdrehung auftritt, da man es eben nicht in der Hand hat, ein Optimum in der spaltenden Wirkung der Schwefelsäure zu erzielen.

Im Gegensatz zu den Resultaten dieser Versuche habe ich in den zwei Fällen, in welchen ich die Vergährung 24 Stunden andauern liess, keinen der soeben besprochenen Befunde constatiren können. Beide Male erhielt ich nach der 24stündigen Vergährung Lösungen, die optisch inactiv waren, Fehling'sche Lösung nicht reducirten und weder die Phloroglucin, noch die Orcinprobe gaben. Es musste also die fragliche Substanz mit dem Zucker mitvergohren sein; und dieser Befund lässt es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass auch in den früheren positiven Versuchen ein Theil der reducirenden Substanz bei der Vergährung zerstört worden ist, eine Thatsache, die übrigens nicht vereinzelt dasteht, da nach den Untersuchungen von Külz und Vogel<sup>1)</sup> und nach den Erfahrungen von Salkowski<sup>2)</sup> auch die Pentosen aus glucosehaltigem Harn bei der Vergährung des Traubenzuckers zum Theil mitvergähren.

Da es mir durch die Ergebnisse aller dieser Versuche sehr wahrscheinlich erschien, dass die Glucuronsäure in irgend einer gepaarten Form im normalen Blute circulirt, ging ich daran, aus grösseren Mengen Blut eine Glucuronsäureverbindung darzustellen. Durch die Arbeiten der letzten Jahre ist die Aufmerksamkeit darauf gelenkt worden, dass bei allen Kohlenhydratuntersuchungen in sorgfältigerer Weise, als dies früher

---

1) Külz und Vogel, Zeitschr. f. Biol., Bd. 32, S. 188.

2) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XXVII, S. 525 und Berl. klin. Wochenschr., 1895, Nr. 17.

oder zu irrthümlichen Deutungen der gewonnenen Resultate führen kann. Der schädigende Einfluss einer auch nur vorübergehenden alkalischen Reaction auf Zuckerlösungen ist besonders von Bickel<sup>1)</sup> überzeugend nachgewiesen worden und die bedeutsamen Forschungen Lobry de Bruyn's<sup>2)</sup> haben gezeigt, dass durch die Einwirkung von minimalen Alkalimengen unter gewissen Bedingungen die Glucose, Mannose und Fructose in einander übergehen können, durch welche Thatsache beispielsweise so mancher Befund von Lävulose seine Erklärung finden dürfte, die wiederholt in Ascitesflüssigkeit aufgefunden worden ist,<sup>3)</sup> wie jedoch aus einer Dissertationsarbeit von Baer<sup>4)</sup> hervorgeht, wahrscheinlich nicht präformirt vorhanden war, sondern lediglich ein Laboratoriumsprodukt darstellt.

Ebenso wie die Wirkung der Alkalien wird auch der schädigende Einfluss von Säuren bei allen Blutuntersuchungen in Betracht gezogen werden müssen, besonders wenn es sich um den Nachweis von Glucuronsäure handelt, die zumal bei gleichzeitiger Einwirkung hoher Temperaturen gegen Säuren ausserordentlich empfindlich ist.

In Berücksichtigung dieser Umstände habe ich streng darauf geachtet, stets bei schwachsaurer Reaction zu arbeiten, und habe alle Einengungen im Vacuumapparat bei einer Temperatur, die 50° niemals überschritt, vorgenommen. Um diese Massregeln einhalten zu können, war besonders die Wahl der Enteiweissungsmethode von Bedeutung. Ich bediente mich für meine Zwecke des Abeles'schen Verfahrens, welches meines Erachtens für Kohlenhydratuntersuchungen im Blut sehr empfehlenswerth ist, weil es den grossen Vorzug hat, dass die

---

1) Bickel, Pflüger's Archiv, Bd. 75, S. 248.

2) Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein, Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas, Bd. 14, S. 103, 156 u. 203.

3) Pickardt, Berl. klin. Wochenschr., Nr. 39, 1897.

4) Baer, Dissertation (Strassburg), 1899.

wichtigsten Operationen in der Kälte ausgeführt werden. Ich nahm 2 Liter Ochsenblut in Angriff, die ich direkt auf dem Schlachthof während des Schlachtens des Thieres in die vorbereitete Zinkacetatalkohollösung fliessen liess, und die dann weiter genau nach der Vorschrift von Abeles<sup>1)</sup> verarbeitet wurden. Durch die wiederholte Behandlung der Rückstände mit Alkohol wuchs schliesslich die Flüssigkeit bis auf 6 Liter an, die successive im Vacuumapparat bei 40—50° abdestillirt und nach der Vertreibung des Alkohols weiter im Vacuum bis auf 1100 ccm. eingeengt wurden. Die so erhaltene wasserklare Lösung erwies sich als völlig eiweissfrei, reducirte Fehling'sche Lösung sehr intensiv, war aber optisch völlig inactiv, zeigte keine Gährung und gab weder die Phloroglucin-, noch die Orcinprobe. Die quantitative Bestimmung der Reduction durch Wägung des gebildeten Kupferoxyduls ergab auf Traubenzucker bezogen einen Zuckergehalt von 2,17 g, so dass der Procentgehalt der verarbeiteten 2 Liter Blut 0,11 betrug, eine Zahl, die mit den gewöhnlichen Angaben übereinstimmt. Bei der sehr starken Verdünnung der Lösung war der negative Ausfall der Gährung und der Drehung nicht besonders auffallend; aber immerhin hätte man bei einer Lösung von 1100 ccm., die wirklich 2,17 g, also fast 0,2% Zucker enthält, eine geringe Rechtsdrehung erwarten müssen. Es wies also auch dieser Befund darauf hin, dass die Reduction ausser durch Traubenzucker noch durch andere reducirende Substanzen veranlasst sein musste. Nach weiterer Concentration der Flüssigkeit im Vacuum bis auf 500 ccm. zeigte die Lösung deutliche Gährung und eine Rechtsdrehung von 0,3%, die einem Gesamtzuckergehalt (in 2 Liter Blut) von 1,5 g i. e. 0,075% entspricht. Dieser Werth bleibt nicht unerheblich hinter dem durch Reduction bestimmten von 2,17 g i. e. 0,11% zurück.

Da ich nun wegen der früher gemachten Erfahrung, dass ein Theil der gesuchten Substanz bei dem Vergähren des Zuckers mitvergährt, die supponirte Glucuronsäure nachzu-

---

1) Abeles, Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. XV, S. 495.

ich aber andererseits auch hier die nach dem Vergähren auftretende Linksdrehung constatiren wollte, habe ich von den 500 ccm. meiner Lösung 100 ccm. zum Vergähren angesetzt; diese zeigten in der That nach dem Vergähren eine sichere Linksdrehung von 0,1—0,2 %. Durch die Spaltung mit Säure wurde die Lösung inactiv; eine Rechtsdrehung trat nicht ein. Die Hauptmenge der aus dem Blut gewonnenen Lösung wurde nun zunächst mit Bleiessig und Ammoniak gefällt, um alle störenden Körper möglichst zu entfernen. Der in  $H_2O$  suspendirte Niederschlag, in den der grösste Theil des Zuckers und die gesuchte Glucuronsäureverbindung übergegangen sein mussten, wurde mit  $H_2S$  zersetzt, und nach Trennung vom ausgeschiedenen Bleisulfid und Befreiung von gelöstem Schwefelwasserstoff durch Einleiten von Luft, restirten 300 ccm. einer Flüssigkeit, die im Vacuum bis auf 150 ccm. eingeengt wurden. Die resultirende Lösung reducirte intensiv, zeigte deutliche Gähung und eine Rechtsdrehung von 0,5 %, und gab in exquisiter Weise die Phloroglucinprobe und die stärkste Orcinreaction. Da für die Darstellung eines Glucuronsäurederivats nur die Neuberg'sche p-Bromphenylhydrazinverbindung<sup>1)</sup> in Betracht kommen konnte, musste es gelingen, wenn Glucuronsäure in der zuckerhaltigen Lösung vorhanden war, dieselbe zu isoliren, ohne den Zucker vorher aus der Flüssigkeit durch Vergähung zu entfernen.

Denn Neuberg<sup>2)</sup> hat festgestellt, dass, während die p-Bromphenylhydrazinverbindungen sämmtlicher Hexosen und Pentosen in absolutem Alkohol löslich sind, allein das glucuronsaure p-Bromphenylhydrazin in absolutem Alkohol vollkommen unlöslich ist. Durch Behandlung mit absolutem Alkohol musste also die Bromphenylhydrazinverbindung der Glucuronsäure von gleichzeitig gebildeten anderen Verbindungen getrennt werden können.

Nachdem ich also die 150 ccm. betragende Lösung in der gewöhnlichen Weise im Autoclaven unter Zusatz von

---

1) C. Neuberg, Ber. d. chem. Ges., Bd. 32, S. 2395—2398.

2) C. Neuberg, Ber. d. chem. Ges., Bd. 33, S. 3323.

1,5 ccm. concentrirter  $H_2SO_4$  der Spaltung unterworfen hatte, um die Glucuronsäure aus ihrer gepaarten Verbindung in Freiheit zu setzen, wurde dieselbe ohne Rücksicht auf noch vorhandene Zuckermengen nach genauer Neutralisation mit Natriumcarbonat mit 3 g p-Bromphenylhydrazinacetat behandelt. Es bildete sich unter Einhaltung der nothwendigen Vorsichtsmassregeln<sup>1)</sup> eine reichliche Menge von gelben Kristallen, die an der Saugpumpe abgesaugt und mit absolutem Alkohol so lange gewaschen wurden, bis der letztere völlig farblos abfloss. Bei der Alkoholbehandlung ging ein nicht unbeträchtlicher Theil in Lösung; es blieb aber eine prachtvoll lichtgelbgefärbte Verbindung zurück, die über  $H_2SO_4$  getrocknet und gewogen wurde. Ich erhielt so 0,1369 g einer p-Bromphenylhydrazinverbindung, deren Schmelzpunkt bei 227° bis 229° lag, sich also auf Grund der Schmelzpunktsbestimmung<sup>2)</sup> und der Unlöslichkeit in absolutem Alkohol als glucuronsaures p-Bromphenylhydrazin charakterisirte. Der exacte Beweis hierfür wurde durch die N-Analyse erbracht, die folgendes Resultat ergab:

0,0842 g Substanz: 5,5 ccm. N (13°, 759 mm.),

$C_{12}H_{17}O_4N_2Br$ : Berechnet: N = 7,35 %,

Gefunden: N = 7,72 %.

Da es somit unzweifelhaft festgestellt war, dass die aus dem Blute von mir gewonnene p-Bromphenylhydrazinverbindung thatsächlich glucuronsaures p-Bromphenylhydrazin war, so ist es sicher erwiesen, dass die Glucuronsäure in gepaarter Form ein normaler Bestandtheil des Rinderblutes ist.

Man wird diesen Befund wohl ohne Weiteres auf das Menschenblut übertragen können, besonders da ich das charakteristische Verhalten des Blutes nach der Vergärung des Zuckers — Linksdrehung, Reduction, Phloroglucin- und Orcinprobe — auch im menschlichen Blute constatirt habe, und meine früheren Untersuchungen es bereits sehr wahr-

1) Bezüglich dieser s. Mayer und Neuberg, Diese Zeitschr., Bd. XXIX, Heft 3, 1900, S. 264, Anm. 2.

2) Das absolut reine glucuronsaure p-Bromphenylhydrazin schmilzt nach Neuberg bei 230°, während der Schmelzpunkt aller anderen von Neuberg untersuchten Bromphenylhydrazinverbindungen unter 210° liegt.

im Blute vorhanden ist, darüber müssen erst weitere Untersuchungen Aufschluss geben. Ebenso wenig bin ich heute im Stande, irgend etwas Sicheres über die quantitativen Verhältnisse auszusagen, zumal selbstverständlich die Möglichkeit vorliegt, dass das Blut ausser der Glucuronsäure noch andere nicht gährende reducirende Substanzen — Jecorin etc. — enthält. — Und eine der wichtigsten Aufgaben weiterer Forschungen wird es gerade sein, die Beziehungen der Glucuronsäure zu dem sogenannten Jecorin des Blutes klarzustellen. Das eine scheint mir bereits jetzt ausser Zweifel zu stehen, dass ein Theil der von den betreffenden Autoren als Jecorin angesprochenen Substanz Glucuronsäure gewesen ist. Denn da die «Gepaarten Glucuronsäuren» in Aether löslich sind, so muss auch die im Blute vorhandene Glucuronsäureverbindung in den Aetherextract des Blutes übergehen; und wenn Jacobsen<sup>1)</sup> findet, dass der in Aether lösliche reducirende Stoff nach dem Kochen mit Säure nicht mehr ätherlöslich ist, so erscheint dies jetzt völlig verständlich; denn durch die Wirkung der Schwefelsäure wird eben die Glucuronsäure von ihrem Paarling abgespalten, und die freie Glucuronsäure ist in Aether unlöslich. Jedenfalls wird der Befund, dass die Glucuronsäure ein normaler Bestandtheil des Blutes ist, in Zukunft bei allen Blutzuckerbestimmungen entsprechend gewürdigt werden müssen, zumal es mir nach meinen eigenen Untersuchungen über die Ausscheidungsverhältnisse der Glucuronsäure zweifellos erscheint, dass in gewissen Fällen, in denen bisher eine Vermehrung des Blutzuckers angenommen worden ist, lediglich der Glucuronsäuregehalt des Blutes erhöht sein dürfte; und dies um so mehr, als bereits Otto<sup>2)</sup> durch quantitative Bestimmung der Reduction vor und nach der Gährung die That- sache constatirt hat, dass in einzelnen Fällen nicht der eigentliche Zuckergehalt, sondern nur die nicht gährende reducirende Substanz vermehrt ist.

---

1) Jacobsen, Skandin. Arch. f. Physiol., 1895.

2) Otto, l. c.

---



# Untersuchungen über das Vorkommen von proteolytischen Enzymen im Thierkörper.

Von

S. G. Hedén und S. Rowland.

(Der Redaction zugegangen am 14. Mai 1901.)

Vor kurzer Zeit haben wir über ein proteolytisches Enzym in der Milz berichtet, das sich dadurch auszeichnet, dass seine Einwirkung auf Eiweissstoffe in saurer Lösung sehr stark ist, während dieselbe in neutraler und besonders in alkalischer Lösung schwach ist oder sich sogar mit der angewandten Methode nicht nachweisen lässt.<sup>1)</sup> Seitdem haben wir Gelegenheit gefunden, unsere Untersuchungen auch auf andere Organe auszudehnen. Die Untersuchungen wurden wie bei den Milzversuchen mit Presssaft von den Organen oder Geweben ausgeführt. Im Folgenden wird für jeden Versuch zunächst die Anzahl Cubikcentimeter  $\frac{1}{10}$  n-Säure angegeben, welche der ganzen Stickstoffmenge von 5 ccm. Saft entspricht;<sup>2)</sup> in der Tabelle wird dann der durch Gerbsäure nicht fällbare Antheil dieser Stickstoffmenge vor und nach der Digestion — auch in Cubikcentimetern  $\frac{1}{10}$  n-Säure ausgedrückt — aufgenommen.<sup>3)</sup> Wie bei den Milzversuchen wurde die Untersuchung vorgenommen:

- 1) in mit Essigsäure (zu 0,25%) oder einer anderen Säure versetztem Saft,
- 2) in dem Presssaft ohne irgend eine Zugabe (schwach saurer Lösung),
- 3) in neutraler und
- 4) alkalischer Lösung.

Die Digestion wurde bei Körpertemperatur vorgenommen, in Gegenwart von Toluol, zur Verhinderung von Bakterienwirkung.

Bei den ersten Versuchen wurde mit Natriumcarbonat neutralisirt und alkalisch gemacht. Da es sich aber heraus-

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 341.

2) Die Bestimmung wurde nach Kjeldahl ausgeführt.

3) Bekanntlich fällt die Gerbsäure, wenn in Ueberschuss vorhanden, weder Pepton noch die Endprodukte der Eiweissverdauung (Hexonbasen und Monamidosäuren).



dass die neutralisirte oder sogar die alkalisirte Lösung 16 Stunden schwach sauer wurde, haben wir bei allen später Versuchen für die Herstellung der neutralen und alkalischen Reaction einen Ueberschuss von Calciumcarbonat resp. Magnesiumoxyd gebraucht. Dabei fragt es sich aber, ob das Alkalisiren mit Magnesia auf die Digestion den gleichen Einfluss ausübt wie das Alkalisiren mit Natriumcarbonat. Dass kein wesentlicher Unterschied vorhanden ist, haben wir an Milzsaft sowie an Pankreassaft nachweisen können. In dem Milzsaft wird die Digestion des Eiweisses durch die Gegenwart sowohl von Magnesiumoxyd, wie von Natriumcarbonat in hohem Grade erschwert, während beide die Digestion des Pankreassafts erleichtern. Da die Einwirkung des Natriumcarbonats in diesen Fällen hinreichend bewiesen wird durch unsere letzte Mittheilung, brauchen wir hier nur Beweise für die Einwirkung von Magnesia darzulegen. Bei der Untersuchung eines Milzsaftes vom Rind fanden wir für die durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoffmenge folgende Zahlen (in Cubikcentimeter  $\frac{1}{10}$  n-Säure ausgedrückt):

	Nach 16 Stunden	Nach 60 Stunden
Mit Essigsäure (0,25%) . . . . .	12,3	12,8
Mit MgO . . . . .	3,3	3,6

Pankreaspresssaft vom Rind, ergab folgende Resultate:  
Gesammtstickstoff 54,7.

	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	37,3	47,1
Ohne Zugabe . . . . .	41,1	49
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	42,6	50
Mit MgO . . . . .	49,6	52

Wir gehen jetzt zu den eigentlichen Versuchen über.

### Milch.

In unserer letzten Mittheilung haben wir über Versuche mit Milch von Rind, Pferd, Schwein und Schaf berichtet. Dazu können wir jetzt einen Versuch mit Hundemilch fügen. Obwohl uns drei Hundemilchen zur Verfügung standen, konnten wir nicht mehr als 20 ccm. Milchsaft darstellen; für den Versuch wurde diese Menge mit dem gleichen Volumen Wasser verdünnt. Reaction sauer. Gesamtstickstoff 24,1.

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure (0,25 %) . . . . .	5,8	19,6
Mit MgO . . . . .	—	6,7

11 ccm. Saft wurden mit 2 g feuchtem Fibrin und Essigsäure (zu 0,25 %) versetzt. Nach 12 Stunden war das Fibrin aufgelöst und das Volumen der ganzen Lösung = 13 ccm. Nach 40 Stunden wurde analysirt. Die durch Gerbsäure nicht fällbare Stickstoffmenge, für das ursprüngliche Saftvolumen umgerechnet, entsprach 25,6 ccm. Säure. Die Kontrollprobe ohne Fibrin ergab 19,6 (siehe die Tabelle). Die Hundemilch verhält sich folglich wie die Milch der übrigen untersuchten Thierarten.

### Lymphdrüsen.

Für die Versuche mit Lymphdrüsen haben wir nur Mesenterialdrüsen von Kälbern gebraucht.

#### Versuch 1.

Gesamtstickstoff 34.

	Vor der Digestion	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden	Nach 60 Stunden
Mit Essigsäure (0,25 %) . . .	6	21	27	27,6
Ohne Zusatz . . . . .	—	—	7,8	—
Mit MgO . . . . .	—	6	7,2	—

10 ccm. des essigsauren Safts in 12 Stunden aufgelöst. Nach 36 Stunden wurde der durch Gerbsäure nicht fällbare, für das ursprüngliche Volumen umgerechnete, Stickstoff 38 ccm. Säure entsprechend, gefunden. Kontrollprobe ohne Fibrin ergab 2 (siehe Tabelle).

## Versuch 2.

Gesamtstickstoff 28,55.

	Vor der Digestion	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden	Nach 84 Stunden
Mit Essigsäure (0,25%) . . . .	4,3	21,4	22,7	24,4
Mit Milchsäure (0,25%) . . . .	—	14,5	17,4	—
Mit HCl (0,1%) . . . . .	—	12,4	15,5	—
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	—	7,2	9,8	—
Mit $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0,2%) . . . . .	—	5,9	8,7	—

Mit Fibrin und Essigsäure wie im vorigen Versuche wurde nach 84 Stunden, für das ursprüngliche Volumen umgerechnet die Ziffer 46 erhalten. Kontrollprobe ohne Fibrin 24,4. In einer Probe mit MgO eingebracht, wurde das Fibrin nicht aufgelöst sondern bildete mit dem Saft eine ziemlich feste Masse, die nicht analysirt werden konnte.

In diesem Versuch wurden zwei Proben mit Phosphorwolframsäure gefällt und der Stickstoffgehalt des Filtrats ermittelt. Vor der Digestion wurde die Zahl 1,6 erhalten und nach 84 Stunden mit Essigsäure die Ziffer 13.

## Nieren.

### Versuch 1 (Kalbsnieren).

Gesamtstickstoff 44,9.

	Vor der Digestion	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden	Nach 60 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	7,6	29,2	37,1	38



Versuch 2 (Kalbsnieren).

Gesammtstickstoff 37,4.

	Vor der Digestion	Nach 12 Stunden	Nach 36 Stunden	Nach 60 Stunden
Mit Essigsäure (0,25 %) . . .	6,4	26,6	29,8	33,4
Mit Milchsäure (0,25 %) . . .	—	21,9	—	—
Mit MgO . . . . .	—	8,0	8,8	9,3

Eine gekochte Probe ergab, sofort untersucht, die Ziffer 7, und mit Essigsäure 36 Stunden digerirt, 7,7. Eine mit Essigsäure und Fibrin (10 ccm. Presssaft + 2 g feuchtes Fibrin) 60 Stunden lang digerirte Probe ergab die Ziffer 57,6 und die Kontrollprobe ohne Fibrin 33,4 (siehe Tabelle). Mit Magnesia und Fibrin wurde die Zahl 9,4 erhalten (Kontrollprobe ohne Fibrin 9,3).

In diesem Versuch wurde auch mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Stickstoffgehalt des Filtrats entsprach vor der Digestion 5,1 ccm. Säure und nach 84 Stunden mit Essigsäure 22,2 ccm.

Versuch 3 (Pferdeniere).

Gesammtstickstoff 52.

	Vor der Digestion	Nach 40 Stunden	Nach 6 Tagen
Mit Essigsäure . . . . .	8	31,5	39,4
Ohne Zusatz . . . . .	—	10,2	11,8
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	—	9	10,8

Mit MgO konnte in diesem Falle keine Bestimmung ausgeführt werden, weil das Ganze durch ausgefälltes Eiweiss in einen dicken Brei verwandelt worden war. Dasselbe war, wenn auch nicht in dem gleichen Grade, der Fall mit den Proben «ohne Zusatz» und mit  $\text{CaCO}_3$ .

Versuch 4 (Hundsnieren).

Von 6 Nieren wurden nur 70 ccm. Presssaft erhalten, wesshalb 30 ccm. Wasser zugegeben wurde.

	Vor der Digestion	Nach 20 Stunden	Nach 40 Stunden
Mit Essigsäure . . . . .	5,4	14,5	15
Ohne Zugabe . . . . .	—	7,3	7,8
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	—	—	6,0
Mit $\text{MgO}$ . . . . .	—	5,4	5,6

Eine gekochte und 40 Stunden mit Essigsäure digerirte Probe ergab 6,8. Das Aufkochen scheint hier, sowie in den meisten Fällen, einen geringen Theil des Eiweisses in durch Gerbsäure nicht fällbare Form übergeführt zu haben.

Der Saft wurde auch mit Fibrin und Essigsäure digerirt (10 ccm. Saft + 2 g feuchtes Fibrin). Nach 12 Stunden war von dem Fibrin nichts mehr zu sehen, und nach 40 Stunden wurde für den nicht fällbaren Stickstoff die Zahl 16,8 erhalten. Da die Kontrollprobe ohne Fibrin die Ziffer 15 ergab (s. Tabelle), ist ersichtlich, dass das Fibrin wohl schnell aufgelöst wurde, aber dass nicht sehr viel davon in «Endprodukte» verwandelt worden war, wahrscheinlich in Folge der Verdünnung des Presssaftes.

Der Presssaft von Lymphdrüsen und von Nieren vermag nach den angeführten Versuchen in saurer Lösung sowohl sein eigenes Eiweiss, wie auch zugesetztes Fibrin zu verdauen; die Einwirkung ist schwächer oder fehlt ganz in neutraler und alkalischer Lösung. Da die Einwirkung nach Aufkochen ausbleibt, können wir folgern, dass die Lymphdrüsen und die Nieren, wie die Milz, eiweissverdauende Enzyme enthalten, die am stärksten in saurer Lösung wirken.

#### Leber.

Bekanntlich hat Salkowski<sup>1)</sup> zuerst in der Leber ein proteolytisches Enzym aufgefunden, das von Schwiening,<sup>2)</sup> Biondi,<sup>3)</sup> sowie neuerdings von Jacoby<sup>4)</sup> des Näheren studirt

1) Zeitschr. f. klin. Medic., 1890, Suppl.

2) Virchow's Archiv, Bd. 136, S. 444.

3) Virchow's Archiv, Bd. 144, S. 373.

4) Diese Zeitschr., Bd. XXX, S. 149.

worden ist. Aus den Versuchen von Schwiening geht hervor, dass die Gegenwart von Natriumcarbonat die Wirkung des Leberenzym schwächt. Da wir sonst keine Angaben über die Bedeutung der Reaction für die Wirksamkeit des Enzyms haben finden können, haben wir hierüber folgende Versuche ausgeführt:

Versuch 1 (Rinderleber).

Gesamtstickstoff 61,5.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 40 Stunden	Nach 14 Tagen
Mit Essigsäure . . . . .	7,8	22,8	30,8	41,2
Ohne Zusatz . . . . .	—	16	21,2	—
Mit MgO . . . . .	—	8,8	9,9	—

Mit Essigsäure und Fibrin wurde nach 14 Tagen die Zahl 53,7 erhalten. Kontrollprobe ohne Fibrin 41,2 (siehe Tabelle). In dem Lebersaft «ohne Zusatz», sowie in dem alkalischen wurde das Fibrin nicht merkbar aufgelöst und das Ganze bildete eine dicke Masse, die nicht analysirt werden konnte.

Versuch 2 (Hundsleber).

Gesamtstickstoff 62,5.

	Vor der Digestion	Nach 20 Stunden	Nach 4 Tagen
Mit Essigsäure . . . . .	8,8	25,4	30,6
Ohne Zusatz . . . . .	—	20	25,8
Mit CaCO <sub>3</sub> . . . . .	—	14,3	19,2
Mit MgO . . . . .	—	9,5	9,5

Das Leberenzym verhält sich also in Bezug auf die günstigste Reaction den von uns gefundenen Enzymen völlig analog.

**Skelettmuskeln.**

In den Skelettmuskeln ist von Salkowski und Schwiening ein Enzym nachgewiesen worden, das zwar sehr schwach ist, aber während sehr lang dauernder Einwirkung das Eiweiss

irgend einen Einfluss ausübt, haben wir Muskelsaft derselben Prüfung wie andere Organe unterzogen.

Versuch 1 (Pferdemuskel).

Gesamtstickstoff 23,1.

	Vor der Digestion	Nach 2 Tagen	Nach 6 Tagen	Nach 12 Tagen
Mit Essigsäure . . . . .	8,5	8,8	9,6	9,6
Ohne Zusatz . . . . .	—	9,5	10,2	11,4
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	—	9,4	10	11,2
Mit $\text{MgO}$ . . . . .	—	8,8	9,4	9,9

Versuch 2 (Pferdemuskel).

Gesamtstickstoff 56,3.

	Vor der Digestion	Nach 2 Tagen	Nach 5 Tagen	Nach 1 Monat
Mit Essigsäure . . . . .	17,8	30,6	33,8	45
Ohne Zusatz . . . . .	—	33,4	36,5	51,4
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	—	31,2	37,1	53,4
Mit $\text{MgO}$ . . . . .	—	33,2	39,6	49,8

Versuch 3 (Hundemuskel).

Gesamtstickstoff 44,1.

	Vor der Digestion	Nach 4 Tagen	Nach 12 Tagen	Nach 26 Tagen
Mit Essigsäure . . . . .	14,7	18	19,5	21,4
Ohne Zusatz . . . . .	—	16,9	21	22,9
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . . .	—	16	17,8	18,4
Mit $\text{MgO}$ . . . . .	—	15,3	15,3	16,6

Eine Probe, die gekocht und ohne irgend eine Zugabe 12 Tage lang digerirt wurde, ergab die Zahl 15,7.

1) Zeitschr. f. klin. Medic., Bd. 17, Suppl., und Virchow's Archiv, Bd. 136, S. 444.

Das Muskelenzym erreicht somit nicht die Stärke der schon von uns abgehandelten Enzyme. Ein bestimmter Unterschied zwischen seiner Wirkung in saurer und alkalischer Lösung lässt sich nicht nachweisen.

#### Herzmuskel.

Da der Herzmuskel histologisch von den Skelettmuskeln verschieden ist, könnte ein in ihm möglicher Weise vorhandenes Enzym von dem der Skelettmuskeln verschieden sein. Folgende Versuche deuten auf ein Enzym hin, das in saurer Lösung etwas stärker wirkt, als in neutraler oder alkalischer. In dieser Beziehung scheint demnach das Herzenzym mit den übrigen von uns nachgewiesenen Enzymen übereinzustimmen.

#### Versuch 1 (Rinderherz). Gesamtstickstoff 35,9.

	Vor der Digestion	Nach 16 Stunden	Nach 8 Tagen	Nach 5 Tagen	Nach 15 Tagen
Mit Essigsäure . .	9,6	13	17,9	19,4	22,6
Ohne Zugabe . . .	—	10,5	13,2	15	17,4
Mit $\text{CaCO}_3$ . . . .	—	10,3	11,8	11,7	13,9
Mit $\text{MgO}$ . . . . .	—	10,2	10,2	11	12,1

#### Versuch 2 (Hundeherz). Gesamtstickstoff 37,6.

	Vor der Digestion	Nach 2 Tagen	Nach 4 Tagen
Mit Essigsäure . . . . .	10,8	16,2	19,4
Ohne Zugabe . . . . .	—	—	14,6
Mit $\text{MgO}$ . . . . .	—	—	12

Eine gekochte und 4 Tage mit Essigsäure digerirte Probe ergab die Zahl 10.

Ausser den schon erwähnten Organen haben wir noch andere Gewebe der Prüfung unterworfen, z. B. Milchdrüsen



und Speicheldrüsen vom Rind. In den meisten Fällen haben wir eine unbedeutende Zunahme des durch Gerbsäure nicht fällbaren Stickstoffs beobachtet, und zwar war diese Zunahme am deutlichsten in mit Essigsäure versetzter Lösung.

Schliesslich sei noch erwähnt, dass wir auch versucht haben, zu eruiren, ob das Blut möglicher Weise ein proteolytisches Enzym enthalte. Im Blutplasma von Pferd und Rind haben wir mit der angewandten Methode keine Spur von einem derartigen Enzym finden können, aber im Presssaft, bereitet von gequetschten Blutkörperchen, findet sich möglicher Weise ein sehr schwaches Enzym. Ob dieses von den weissen oder von den rothen Blutkörperchen herrührt, steht noch dahin.

Die bis jetzt von uns gewonnenen Resultate können folgendermassen zusammengefasst werden:

Bei allen von uns untersuchten Thierarten enthalten die Milz, die Lymphdrüsen, die Nieren und die Leber proteolytische Enzyme, welche ihre stärkste Wirkung in saurer Lösung entfalten.

Die Skelettmuskeln besitzen auch ein proteolytisches Enzym, das indessen relativ schwach ist und keinen deutlichen Unterschied in Bezug auf die Wirkung in saurer, neutraler oder alkalischer Lösung darbietet. Ein im Herzmuskel gefundenes Enzym nähert sich in Bezug auf seine Wirkung den eben abgehandelten Organenzymen.

Weitere Untersuchungen über die von uns gefundenen Enzyme sind schon in Angriff genommen.

London, Jenner Institute of preventive Medicine, den 7. Mai 1901.



# **Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.**

Von

**P. A. Levene.**

---

(Aus der physiologisch-chemischen Abtheilung des pathologischen Instituts der  
New-Yorker Staatskrankenhäuser.)

(Der Redaction zugegangen am 14. Mai 1901.)

---

Vor ungefähr einem Jahre habe ich eine Mittheilung über die Darstellung der Nucleinsäuren und später gemeinschaftlich mit C. Alsberg eine Analyse der Vitellinsäure und ich selber eine Analyse der Ichthulinsäure veröffentlicht. Wenn nun auch meine Arbeiten über die Analyse der Nucleinsäure noch nicht ganz zum Abschluss gebracht sind, so glaube ich doch, dass eine Veröffentlichung der gewonnenen Resultate in Rücksicht auf einige jüngst erschienene Publicationen nicht ohne Interesse sein wird.

## **I. Pankreasnucleinsäure.**

Die Säure wurde direkt aus frischen Drüsen erhalten. Sie wurden zerhackt, mit einer 8%igen Lösung von Ammoniak behandelt und unter Zugabe von etwas essigsaurem Ammoniak zwei Stunden lang stehen gelassen. Dann wurde mit Eisessig langsam und unter Kühlung mit Eis neutralisirt. Wenn die Reaction fast neutral war, wurde ein Ueberschuss von Pikrinsäure hinzugefügt und dann wiederum Eissigsäure bis zur deutlich sauren Reaction. Nun wurde filtrirt und das Filtrat mit einem Ueberschuss von 95%igem Alkohol gefällt. Der Niederschlag wurde wieder in Wasser unter Hinzufügen von etwas Alkali gelöst, die Lösung mit essigsaurem Natron versetzt und dann mit Eissigsäure angesäuert. Ein hierbei entstehender,

nur wenig Nucleinverbindungen enthaltender Niederschlag wurde durch Filtration entfernt, das Filtrat mit Kochsalz gesättigt und mit Salzsäure versetzt, bis es auf Congopapier sauer reagierte, dann wurde das gleiche Volumen Alkohol hinzugefügt und der entstandene Niederschlag sich absetzen gelassen. Die darüber stehende Flüssigkeit wurde abgehebert, der Niederschlag durch Decantation mit 50%igem Alkohol gewaschen und dann auf ein Filter gebracht. Die Nucleinsäure wird schon theilweise durch Salzsäure ohne Alkohol gefällt, aber der letztere erleichtert das Waschen und die Filtration und erhöht die Ausbeute.

In den meisten Fällen ist der so gebildete Niederschlag biuretfrei; sollte er es nicht sein, so muss er noch einmal in Wasser wieder unter Zusatz von Alkali und essigsaurem Natron gelöst werden, die Lösung dann mit Kochsalz gesättigt und, wie oben angegeben, mit Salzsäure und Alkohol gefällt werden. Auch der biuretfreie Niederschlag enthielt indessen Spuren von Glycogen und, um das letztere zu entfernen, wurde die Nucleinsäure mit Kupferchlorid niedergeschlagen, während die Kupferverbindung des Glycogens in Lösung blieb. Diese Methode zur Entfernung der Kohlehydrate aus Hefenucleinsäure ist zuerst von Herlant veröffentlicht, war aber vor der Veröffentlichung dieser interessanten Arbeit schon von mir angewandt. Die Kupfersalze der Nucleinsäure werden zunächst mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser kupferfrei ist, dann mit Alkohol, bis sie chlorfrei wurden, und endlich mit Aether; getrocknet wurden sie im Vacuum über Schwefelsäure und zum Schluss im Luftbade.

Die freie Säure ist unlöslich in Wasser, löst sich aber beim Zusatz von etwas Alkali; essigsaure Alkalien befördern die Löslichkeit. Aus solchen Lösungen kann die Säure nicht durch Essigsäure, aber theilweise durch Salzsäure niedergeschlagen werden. In dieser Hinsicht besitzt sie also dieselben Löslichkeitsverhältnisse wie andere Nucleinsäuren; aus concentrirten Lösungen jedoch kann die Säure oder wahrscheinlich ein saures Natronsalz derselben durch Kochsalz und Essigsäure theilweise niedergeschlagen werden, durch

einen Ueberschuss von Wasser wird aber der Niederschlag wieder gelöst. Für die Analyse wurde allgemein das Kupfersalz verwendet. Vor der Behandlung mit Kupfer wurde die Nucleinsäure auf freie Purinbasen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung geprüft, ohne Erfolg.

Alle Kupfer- und Phosphorbestimmungen wurden nach vorherigem Schmelzen mit Soda und Salpeter gemacht; der Stickstoff wurde nach Dumas bestimmt.

### Präparat 1.

Der erste Alkoholsalzsäureniederschlag, den ich, wie oben beschrieben, erhielt, gab noch eine geringe Biuretreaction und wurde wiederholt umgefällt.

0,5820 g der Substanz gaben 0,151 g  $Mg_3P_2O_7$  und 0,1130 CuO.  
P = 7,26 %. Cu = 15,99 %.

0,200 g gaben 26,3 ccm. N, bei p = 71,8 und t = 17°. N = 14,37 %.

0,200 g gaben 26,4 ccm. N, bei p = 71,6 und t = 15°. N = 14,54 %.

### Präparat 2.

Das in bekannter Weise gewonnene Kupfersalz zeigte sich leicht löslich in alkalihaltigem Wasser. Aus dieser Lösung schlug Salzsäure nur einen Theil der Nucleinsäure nieder und es war möglich, dass der in der Salzsäure in Lösung gebliebene Antheil eine andere Zusammensetzung hatte, wie der Niederschlag. Der ungelöste Theil wurde in Wasser unter Zugabe von Alkali wieder aufgelöst, die Lösung mit Essigsäure angesäuert und das Kupfersalz wieder gewonnen, das im Vacuum und dann im Luftbade bei 90° bis zur Gewichtsconstanz getrocknet wurde.

0,1799 g gaben bei der Verbrennung 0,2118 g  $CO_2$  und 0,0646 g  $H_2O$ .  
C = 32,16 % und H = 4,00 %.

0,1255 g lieferten 0,1489 g  $CO_2$  und 0,0487 g  $H_2O$ . C = 32,35 %  
und H = 4,26 %.

0,1500 g gaben 19,6 ccm. N bei p = 71,6 und t = 11°. N = 14,71 %.

0,2870 g gaben 0,0457 g CuO und 0,0815 g  $Mg_3P_2O_7$ . Cu = 12,77 %  
P = 7,93 %.

In derselben Weise gewonnen wie vorher. Der erste Alkoholsalzsäureniederschlag war biuretfrei.

0,1315 g gaben 17,7 ccm. N bei  $p = 71,2$  und  $t = 12,5^\circ$ . N = 14,91 %.

0,1245 g gaben 0,0180 g CuO und 0,0391 g  $Mg_3P_2O_7$ . Cu = 11,51 %.  
P = 7,97 %.

#### Präparat 4.

Die Drüsen wurden, wie auch bei dem vorigen Präparate, eine längere Zeit unter Alkohol gehalten, dann mit 5%iger Natronlauge unter Zufügung von Natriumacetat behandelt. Nach einigem Stehen wurde mit Eisessig neutralisirt, dann Pikrinsäure und zuletzt Essigsäure zugesetzt, bis die Flüssigkeit sauer reagierte. Sie wurde filtrirt und das Filtrat mit Kupferchlorid gefällt. Der Niederschlag wurde dann ebenso wie bei der Darstellung des Präparates Nr. 1 weiter behandelt.

0,1089 g gaben 0,1305  $CO_2$  und 0,0448 g  $H_2O$ . C = 32,68% und H = 4,57 %.

0,1285 g gaben 17,6 ccm. N bei  $p = 71,3$  und  $t = 10^\circ$ . N = 15,86 %.

0,1250 g gaben 0,0346 g  $Mg_3P_2O_7$ . P = 7,73 %.

0,1421 g gaben 0,0189 g CuO. Cu = 10,61 %.

#### Abbau der Säure.

Erster Versuch: Ungefähr 2 g der Säure, die mit ammoniakalischer Silberlösung keinen Niederschlag von Purinbasen gaben, wurden mit 100 ccm. 5%iger Schwefelsäure  $2\frac{1}{2}$  Stunden im Autoclaven bis  $118^\circ$  gekocht, dann das Guanin auf die gewöhnliche Weise entfernt. Die Analyse des erhaltenen Silbernitrats ergab:

0,283 g lieferten 0,0935 g Ag. Ag = 33,04 %.

Für  $C_5H_4N_4O \cdot AgNO_3$

Gefunden:

berechnet: Ag = 33,65 %.

33,04 %.

Das mit Ammoniak versetzte Filtrat wurde eingedampft, ohne dass ein Niederschlag entstand, dann mit ammoniakalischer Silberlösung ein starker gelatinöser Niederschlag erzeugt. Aus diesem wurden in bekannter Weise die einzelnen Alloxurbasen zu erhalten versucht, aber die Xanthin- und Hypoxanthin-

fraction enthielten nur Spuren von Silbersalzen, dagegen konnte reichlich Adenin in Form seines Pikrates erhalten werden.

0,1256 des Pikrates gaben 34,4 ccm. N, bei  $p = 72,4$  und  $t = 13^{\circ}$ .  
N = 30,81 %.

Zweiter Versuch: Ungefähr 3 g wurden wie beim ersten Versuch behandelt, das Adenin wieder als Pikrat gefällt.

0,206 g gaben 58,8 ccm. N bei  $p = 72,13$  und  $t = 22^{\circ}$ . N = 30,65 %.

Berechnet für  $C_8H_5N_5 \cdot C_6H_3(NO_2)_3OH$ :  
N = 30,71 %.

Gefunden:

- I. N = 30,81 %
- II. N = 30,65 %.

Dann wurde ferner ein Versuch gemacht, Thymin zu gewinnen. 3 g der Säure wurden mit 300 ccm. 30%iger Schwefelsäure 4 Stunden im Autoclaven bei  $130^{\circ}$  gekocht, dann nach der Methode von W. Jones weiter verfahren, aber keine krystallinischen Produkte gewonnen. Aber dieses negative Resultat mit einer verhältnissmässig geringen Quantität Säure beweist doch noch nicht unbedingt das Fehlen des Thymins unter den Spaltungsprodukten. Im Gegentheil scheint mir, gestützt auf ein anderes meiner Experimente, das Vorkommen von Thymin nicht unwahrscheinlich. Einige Pfund Pankreas wurden nämlich mit einer 0,5%igen Lösung von Natriumcarbonat und einem grossen Ueberschuss von Chloroform versetzt und über Nacht stehen gelassen. Die Flüssigkeit wurde dann colirt und das Filtrat in mehrere Kolben vertheilt, die unter Chloroformzugabe einige Wochen in den Brutschrank bei  $40^{\circ}$  gestellt wurden. Dann wurde der Inhalt der Kolben in grosse Flaschen übertragen, die etwa 7 Monate in einem sehr warmen Zimmer stehen blieben. (Vom September 1899 bis Mai 1900.)

Nach Verlauf dieser Zeit waren die Nucleinverbindungen des ursprünglichen Extractes zersetzt, wie sich aus der Bestimmung des Gesamtposphorgehaltes und des Phosphors in Form anorganischer Salze ergab. Das Histidin und Arginin wurden dann nach Kossel mittelst Silbernitrat und Baryt ausgefällt und beide Niederschläge auf Thymin untersucht; in der Histidinfraction nun wurde kein Thymin gefunden, dagegen

des Silbers und des Baryts eine Krystallhaut, die aus büschelförmig angeordneten Nadeln bestand. Die Substanz war leicht löslich in heissem, unlöslich in kaltem Wasser, unlöslich in Alkohol, Aether und in Alkohol, der Ammoniak enthielt. Sie sublimirte, wenn auch nicht vollständig.

Der Körper wurde auf einer Saugpumpe filtrirt, mit etwas kaltem Wasser, dann mit Alkohol und Aether gewaschen und im Vacuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,0819 g gaben 0,12535 g  $\text{CO}_2$  und 0,02434 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 42,07 %, H = 3,33 %.

Berechnet für  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2$ :

C = 42,85 %

H = 3,57 %.

Gefunden:

C = 42,07 %

H = 3,33 %.

Die Substanz war dem Körper sehr ähnlich, den Ascoli neulich aus Hefenucleinsäure gewonnen und als Uracil betrachtet hat.

In einem anderen Theile desselben selbstverdauten Extractes wurde das Histidin und das Arginin zusammen entfernt, dann das Silber, die Schwefelsäure und der Ueberschuss von Baryt fortgeschafft und die Lösung concentrirt. Nach genügendem Einengen bildete sich auch hier eine Haut, die mikroskopisch untersucht, aus Krystallen bestand, die den von Gulewitsch für Thymin beschriebenen gleich waren, allerdings vermischt mit sphäroidalen Massen. Die Substanz war wenig löslich in kaltem, löslich in heissem Wasser, unlöslich in Alkohol und Aether. Bei einer Umkrystallisation aus Wasser gelang es mir aber nicht, die Thyminkrystalle zu isoliren. So wie die Sache also steht, scheint es mir annehmbar, dass bei der Selbstverdauung des Pankreas Thymin und Uracil unter den Zersetzungsprodukten auftreten mögen, und wenn es der Fall ist, dann sind sie aus den Nucleinverbindungen des Pankreas entstanden. Ich hoffe in meinen nächsten Versuchen diese Frage entscheiden zu können. Zu bemerken bleibt noch, dass beim Erhitzen meiner Nucleinsäure zwischen zwei Uhrschildchen ein aus schönen mikroskopischen Krystallen bestehendes Sublimat auftritt.

Eine kupferreducirende Substanz konnte beim Erwärmen der Säure mit Mineralsäuren nicht erhalten werden und in dieser Hinsicht ist meine Pankreasnucleinsäure mehr der Säure ähnlich, die Kossel, Miescher, Schmiedeberg, Osborne und Andere gewonnen haben, dagegen von der Guanylsäure verschieden, die von Bang als die Nucleinsäure des Pankreas beschrieben worden ist.

Die Aufgabe meiner weiteren Untersuchungen wird sein, das Verhältniss der Guanylsäure zu der Pankreasnucleinsäure zu ergründen.

### Nucleinsäure aus Milz.

Einige Pfund des Organes, längere Zeit unter Alkohol aufbewahrt, wurden mit einer 5%igen Natronlauge behandelt und nach Zufügen von Natriumacetat ungefähr 2 Stunden stehen gelassen, dann mit Essigsäure neutralisirt, Pikrinsäure hinzugefügt und die Flüssigkeit mit Essigsäure angesäuert. Das Filtrat wurde mit Kupferchlorid gefällt, der Niederschlag einige Male mit Wasser gewaschen und noch einmal umgefällt. Er war dann biuretfrei.

0,1127 g gaben 0,1337 g  $\text{CO}_2$  und 0,0484 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 32,37% und H = 4,77%.

0,1130 g gaben 15,7 ccm. N bei  $p = 71,9$  und  $t = 16^\circ$ . N = 15,3%.

0,1356 g gaben 0,0190 g CuO und 0,0390 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ . Cu = 11,17% und P = 8,02%.

### Nucleinsäure aus den Spermatozoen des Kabeljau.

Die Spermatozoen wurden in derselben Weise gewonnen, wie Kossel es that, um das Protamin zu gewinnen. Das bekannter Weise dargestellte Kupfersalz gab folgende Werthe:

0,1783 g lieferten 0,2051 g  $\text{CO}_2$  und 0,0745 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 31,37% und H = 4,66%.

0,1029 g lieferten 0,1182 g  $\text{CO}_2$  und 0,0745 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 31,32% und H = 4,66%.

0,2038 g lieferten 27,8 ccm. N bei  $p = 71,8$  und  $t = 15^\circ$ . N = 15,12%.

0,1486 g lieferten 0,0182 CuO und 0,043 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ . Cu = 9,84% und P = 8,21%.



Für diesen Versuch wurde Bäckerhefe benutzt und aus ihr das Kupfersalz der Nucleinsäure nach der bekannten Methode dargestellt, das biuretfrei war und, mit Säuren erhitzt, Fehling'sche Lösung nicht reducirte.

0,1033 g gaben 0,1232 g  $\text{CO}_2$  und 0,0376 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 32,42% und H = 4,04%.

0,1058 g gaben 15,4 ccm. N bei  $p = 70,6$  und  $t = 14^\circ$ . N = 15,83%.

0,1539 g gaben 0,0223 g  $\text{CuO}$  und 0,0439 g  $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7$ . Cu = 11,56% und P = 7,90%.

In der folgenden Tabelle sind die Resultate der Analysen, auf kupferfreie Substanz berechnet, zusammengestellt:

	C	H	N	P
Pankreas I	—	—	17,10 %	8,66 %
„ II	36,50 %	4,69 %	16,70 %	8,73 %
„ IV	—	—	16,85 %	9,00 %
„ V	36,67 %	5,10 %	17,18 %	8,65 %
Milz	36,40 %	5,24 %	17,30 %	9,03 %
Kabeljau	34,76 %	5,16 %	16,77 %	9,15 %
Hefe	36,65 %	4,57 %	17,89 %	8,93 %

Aus der Uebersicht ergibt sich, dass erstens aus der Pankreasdrüse eine Nucleinsäure gewonnen werden kann, die ihrem Charakter nach mehr der Säure gleicht, die von Kossel, Miescher, Schmiedeberg, Herlant, Osborne und Anderen aus verschiedenen Organen gewonnen wurde, als der von Ivar Bang als Guanylsäure bezeichneten. Zweitens ist die aus der Hefe erhaltene Säure von der Myconucleinsäure Herlant's verschieden.

Es wäre voreilig, irgend welche Schlussfolgerungen betreffs der Formel der Nucleinsäure zu machen, doch scheint es mir wahrscheinlich, dass eine Nucleinsäure von derselben Zusammensetzung aus allen Organen gewonnen werden kann, und obgleich die Präparate der Nucleinsäure, die von Miescher, Schmiedeberg, Herlant und mir untersucht wurden, keine gleiche Zusammensetzung hatten, so ist doch der Unterschied nicht sehr gross.

Dagegen habe ich vergeblich versucht, aus Bacillen eine ähnliche Säure zu gewinnen. Zwar hat Ruppel in den Tuberkelbacillen eine freie Nucleinsäure gefunden, die «Tuberkulinsäure», die er aber nicht näher untersucht hat, aber vorher hatte ich schon das Vorkommen eines Nucleoproteids festgestellt. Da es nun nicht unwahrscheinlich war, dass die freie Säure von der Säure des Nucleoproteids verschieden war, suchte ich sie für sich zu isoliren.

Trockene pulverisirte Bakterien werden wiederholt mit einer 5%igen Kochsalzlösung extrahirt, das Extract mit Pikrinsäure und Essigsäure gefällt und filtrirt. Der in dem Filtrat mit Alkohol erzeugte biuretfreie Niederschlag wurde mit Kupferchlorid behandelt, der Niederschlag gewaschen und in gewöhnlicher Weise getrocknet. Der Rückstand von dem Kochsalzextract wurde mit einer 5%igen Sodalösung behandelt, Natron hinzugefügt und 2 Stunden stehen gelassen. Nachdem sodann mit Essigsäure neutralisirt, Pikrinsäure und Essigsäure bis zur sauren Reaction hinzugefügt und filtrirt war, wurde im Filtrat mit Alkohol ein Niederschlag erzeugt, der biuretfrei war. Dieser wurde wieder in Lösung gebracht und das Kupfersalz der Nucleinsäure in der gewöhnlichen Weise dargestellt.<sup>1)</sup>

#### Präparat 1.

Freie Säure, gewonnen, wie oben angegeben.

0,1089 g gaben 0,1359 g  $\text{CO}_2$  und 0,0490 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 34,83% und H = 4,99%.

0,1270 g gaben 0,1592 g  $\text{CO}_2$  und 0,0553 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 34,28% und H = 4,87%.

0,1015 g gaben 11,5 ccm. N bei  $p = 71,4$  und  $t = 10,5^\circ$ . N = 12,67%.

0,1557 g gaben 0,0210 g CuO und 0,045 g  $\text{Mg}_3\text{P}_2\text{O}_7$ . Cu = 10,75% und P = 8,07%.

#### Präparat 2.

Gewonnen aus dem Rückstand, nachdem die Bacillen mit Kochsalz extrahirt waren.

0,10059 g gaben 0,1101 g  $\text{CO}_2$  und 0,0441 g  $\text{H}_2\text{O}$ . C = 29,88% und H = 4,87%.

<sup>1)</sup> Die Versuche mit den Bakterien wurden in Dr. E. L. Prudeau's Laboratorium (Saranac Lake, N.Y.) ausgeführt, und ich möchte auch an dieser Stelle ihm meinen besten Dank aussprechen.

0,1171 g gaben 11,5 ccm. N bei  $p = 71,5$  und  $t = 15,5^\circ$ . N = 11,71%  
 0,2070 g gaben 0,0378 g CuO und 0,0614 g  $Mg_3P_2O_7$ . Cu = 14,45%  
 und P = 8,82%.

### Präparat 3.

Statt mit Kochsalz wurden die Bakterien mit 8%igem Ammoniumchlorid extrahiert, der Rückstand in gewöhnlicher Weise mit 5%iger Natronlauge, Essig- und Pikrinsäure behandelt. Der mit Alkohol im Filtrate erzeugte Niederschlag wurde wieder in Natronlauge gelöst, mit Essigsäure angesäuert und mit Alkohol gefällt, der 0,5% HCl enthielt. Die ausgefallene Nucleinsäure wurde mit 50%igem, zuletzt mit 95%igem Alkohol chlorfrei gewaschen, nochmals gelöst und als Kupfersalz wieder gewonnen.

0,157 g gaben 10,8 ccm. N bei  $p = 72,1$  und  $t = 19^\circ$ . N = 7,49%.

0,2807 g gaben 0,074 g CuO und 0,105 g  $Mg_3P_2O_7$ . Cu = 21,04%  
 und P = 10,44%.

### Präparat 4.

In derselben Weise gewonnen wie Nr. 3.

0,2502 g gaben 0,0725 g CuO und 0,0877 g  $Mg_3P_2O_7$ . Cu = 23,13%.

### Präparat 5.

Gewonnen wie Präparate 3 und 4.

0,1343 g gaben 0,1380 g  $CO_2$  und 0,0625 g  $H_2O$ . C = 28,07% und  
 H = 5,12%.

0,1708 g gaben 12,3 ccm. N bei  $p = 71,8$  und  $t = 16^\circ$ . N = 7,90%.

0,175 g gaben 0,0355 g CuO und 0,0685 g  $Mg_3P_2O_7$ . Cu = 16,77 und  
 P = 10,94%.

Folgende Tabelle gibt die Resultate der Analysen, auf Cu-freie Substanz berechnet:

	C	H	N	P
Präparat I	38,94 %	5,82 %	14,19 %	9,04 %
„ II	35,00 %	5,77 %	12,51 %	10,31 %
„ III	—	—	9,49 %	13,22 %
„ IV	—	—	—	12,73 %
„ V	33,36 %	6,14 %	9,42 %	13,05 %



# Ueber die quantitative Bestimmung der Harnsäure im Harn.

Von

Otto Folin und Phil. A. Shaffer.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des «Mc Lean Hospital» für Irrenkranke,  
Waverley, Mass. U. S. A.)

(Der Redaction zugegangen am 24. Mai 1901.)

---

Vor etwa drei Jahren publicirte der eine von uns eine Modification der Hopkins'schen Methode zur Bestimmung der Harnsäure im Harn.<sup>1)</sup> Das Verfahren schien damals durch direkte Titrirung der durch Ammonsalze ausgeschiedenen Ammonurate zuverlässige Werthe zu liefern. Seither haben aber Nachprüfungen von Wörner,<sup>2)</sup> sowie auch von Jolles<sup>3)</sup> die Genauigkeit der Methode nicht bestätigt und es muss ohne Weiteres zugegeben werden, dass die Einwendungen beider Forscher bis zu einem gewissen Grade berechtigt sind. Die Methode war auf ihre Genauigkeit, besonders bei pathologischen Harnen, nicht genügend geprüft worden und die weiteren, in der ersten Abhandlung in Aussicht gestellten Untersuchungen mussten wegen Zeitmangels verschoben werden. Dennoch waren die Untersuchungen, welche die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden, schon im Gange, als die Abhandlung von Wörner und die von Jolles erschienen.

Da bei den zu beschreibenden Untersuchungen auch Salkowski's Methode immer wieder für Parallelbestimmungen benutzt wurde, erscheint es zweckmässig, einige Bemerkungen über diese Methode vorausszuschicken.

---

1) Diese Zeitschrift, Bd. XXIV, S. 224.

2) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 70.

3) Diese Zeitschrift, Bd. XXIX, S. 22.

### Salkowski's Methode.

Salkowski's Methode der Harnsäurebestimmung ist bekanntlich, kurz gefasst, folgende: Der bis zum spezifischen Gewicht von 1,020 verdünnte Harn wird zuerst durch Magnesia-mischung von Phosphaten befreit. Die Fällung der Harnsäure und Alloxurbasen wird durch Zusatz von Silbernitrat und Ammoniak bewirkt, die entstehende Fällung durch  $H_2S$  zersetzt und das Filtrat bis zu etwa 15 ccm. eingedampft und nach Ansäuern 24 Stunden stehen gelassen behufs Auskristallisierung der Harnsäure.

Aus unseren Erfahrungen über diese Methode lässt sich nun Folgendes entnehmen:

1. Die Fällbarkeit der Harnsäure als Silbermagnesiumsalz ist fast vollkommen quantitativ. Dies ist leicht bei Anwendung reiner Harnsäurelösungen und chlorfreier Magnesia-mischung durch direkte Titrirung der Silberfällungen sowie der Filtrate mit  $n/20$  Kaliumpermanganatlösung nachzuweisen. In 150 ccm. des Filtrates war im Mittel nur etwa 0,5 mg Harnsäure vorhanden.

2. Bei Anwendung des Silberverfahrens nach Ludwig werden bekanntlich die Phosphate und der Silbermagnesia-niederschlag zusammen ausgefällt, während nach Salkowski erstere zuvor abfiltrirt werden. Nach unseren Ergebnissen ist nun das Ludwig'sche Verfahren das richtigere, denn etwas Harnsäure wird immer durch das Magnesiumphosphat mitgerissen. Der nach der Salkowski'schen Methode hierbei entstehende Verlust beträgt aus 100 ccm. normalen Harnes im Mittel etwa 2 mg Harnsäure. Eine genaue Prüfung dieser Thatsache wurde durch Benutzung reiner Harnsäurelösungen ermöglicht. Als Beispiel sei folgender Versuch angeführt: Reine Harnsäure wurde unter Zusatz von etwas Lithiumcarbonat in 2 Liter Wasser gelöst, die Lösung in zwei gleiche Theile getheilt und dem einen 25 ccm. Wasser, dem anderen 25 ccm. Natriumphosphatlösung zugesetzt. Direkte Titrirung ergab in beiden Lösungen den gleichen Harnsäuregehalt, nämlich 77,6 mg pro 100 ccm. Darauf wurden 100 ccm. chloridfreie Magnesia-

mischung<sup>1)</sup> zu 500 ccm. der Phosphat enthaltenden Harnsäurelösung zugesetzt und sogleich filtrirt. 150 ccm. Filtrat, nach dem Ansäuern titirt, ergab 75,2 mg Harnsäure, entsprechend also einem Verlust von 2,4 mg Harnsäure.

Der genannte, nach Salkowski's Verfahren entstehende Verlust an Harnsäure war übrigens auch bei Harnen durch vergleichende, in üblicher Weise ausgeführte Bestimmungen zu constatiren. Angesichts dieser Thatsache wurden die Phosphate bei unseren späteren Harnsäurebestimmungen nach dem Silberverfahren immer zusammen mit der Harnsäure herausgefällt. Hier muss jedoch bemerkt werden, dass man bei dem Wägen der Harnsäure nach Salkowski der Gefahr ausgesetzt ist, wegen der kleinen Menge Wasser, die benutzt werden darf, nicht alle Phosphate von dem Filter entfernen zu können. Es ist übrigens auch schwierig, die letzten, wegen ihrer Durchsichtigkeit kaum sichtbaren Harnsäurekrystalle durch etwa 30 bis 50 ccm. Waschwasser von der Abdampfschale auf das Filter zu spülen. Da auch die nach Salkowski isolirte Harnsäure sich in schönster Weise titiren lässt, empfiehlt es sich, die Harnsäure auch hier zu titiren, anstatt zu wägen.<sup>2)</sup> Man braucht dann gar nicht die letzten Spuren Harnsäure auf das Filter zu waschen, sondern kann diese nachher direkt in das Becherglas spülen.

3. Nachdem die Harnsäure als Silbermagnesiaverbindung aus dem Harn abgeschieden ist, wird diese Verbindung nach Salkowski bei saurer Reaction durch  $H_2S$ , nach Ludwig in alkalischer Lösung durch KHS entsilbert. Die erstere Methode

---

1) Ammonsulfat wurde benutzt anstatt Ammonchlorid, um die Magnesia in Lösung zu erhalten.

2) Bei der Titrirung der nach Salkowski isolirten Harnsäure muss diese vor dem Schwefelsäurezusatz mit Hilfe von ein wenig Natronlauge aufgelöst werden. Die hierzu benutzte Natronlauge soll nicht «durch Alkohol gereinigt» sein, weil in diesem Falle die Natronlauge immer etwas Natriumalkoholat, welches das Permanganat reducirt, enthält. Indessen kann dieser Alkohol leicht durch Kochen mit ein ganz wenig Natriumperoxyd entfernt werden, nur muss man selbstverständlich dabei das Kochen fortsetzen, bis auch das Natriumperoxyd vollständig zersetzt ist.

ist sicher der Ludwig'schen, wegen der Zersetzlichkeit der Harnsäure durch Alkalien, vorzuziehen.<sup>1)</sup>

Die Zersetzung der Silberfällung nach Salkowski ist indessen auch ein sehr missliches Verfahren. Es gelingt nämlich fast nie, alles Silber als Silbersulfid auf dem Filter aufzufangen. Man muss daher nach Salkowski's<sup>2)</sup> letzten Angaben die erhaltenen Filtrate mehrere Male auf das Filter zurückgiessen, darauf dieselben eindampfen und nochmals filtriren, wobei man der Gefahr ausgesetzt ist, auch auskrystallisirte Harnsäure mit dem Silbersulfid zu entfernen. Diese der Salkowski'schen Methode anhaftende Schwierigkeit lässt sich nun einfacher Weise durch Zusatz von etwas Kupfersulfat vor der Zerlegung durch  $H_2S$  beseitigen. Die Zersetzung wird in folgender Weise ausgeführt: Der gewaschene Silberniederschlag wird in ein Becherglas gespült, bis auf etwa 250 ccm. verdünnt und nach Zusatz von 5 bis 10 ccm. 1%iger Kupfersulfatlösung und etwas Salzsäure zum Sieden erhitzt.

Durch die noch siedende Flüssigkeit wird  $H_2S$  geleitet und das Kochen einige Minuten nach der Sättigung mit Schwefelwasserstoff fortgesetzt. Nach diesem Verfahren erhält man sogleich vollständig klare Filtrate, aus denen durch das nachherige Eindampfen kein Silbersulfid sich abscheidet.

4. Bei der Benutzung der Salkowski'schen Methode soll noch die anzuwendende Correctur berücksichtigt werden. In der letzten Auflage seines Practicums hat sich Salkowski

---

<sup>1)</sup> Die leichte Zersetzlichkeit der Harnsäure durch Alkalien ist anscheinend bei mehreren Forschern nicht genügend berücksichtigt worden. (Vide z. B. Horbaczewski, Ueber die Trennung der Harnsäure von Xanthin. Diese Zeitschrift, Bd. XVIII, S. 343.) Man kann diese Zersetzung genau titrimetrisch verfolgen: Eine Harnsäurelösung, die 0,04 gm NaOH und 35,6 mg Harnsäure pro 100 ccm. Harnsäure enthielt, wurde gerade zum Kochen erhitzt und sogleich abgekühlt. Aus dieser Lösung wurde nun nur 33,6 mg Harnsäure wiedergefunden, entsprechend also einem Verluste von 6% Harnsäure. Eine andere Lösung, die 1,5 g NaOH und 88 mg Harnsäure pro 100 ccm. enthielt, wurde 45 Minuten lang auf einem Wasserbade erhitzt: 60 mg Harnsäure, entsprechend einem Verluste von 28 mg oder 32%, wurden wiedergefunden.

<sup>2)</sup> Vide Salkowski's Practicum, 2. Aufl., S. 250.



hierüber folgendermassen geäussert: «Bei der Berechnung (des Harnsäuregehaltes) ist es üblich, eine Correctur für die Löslichkeit der Harnsäure anzubringen, doch kann man diese höchstens für den Fall als zulässig ansehen, dass die Quantität der Harnsäure nicht abnorm gering ist, und die Quantität von Filtrat und Waschwasser 60 ccm. nicht überschreitet. Man pflegt für je 10 ccm. desselben 0,5 mg Harnsäure zu addiren». Demnach scheint Salkowski jetzt die Anwendbarkeit der obigen Correctur für etwas fraglich zu halten. Da diese aber 3 mg Harnsäure pro 100 ccm. Harn, als circa 5% der ganzen Harnsäuremenge beträgt, kann der Salkowski'schen bezw. der Ludwig'schen oder der Hopkins'schen Methode zur Bestimmung der Harnsäure kaum die übliche grosse Genauigkeit zugeschrieben werden, solange nicht die Anwendbarkeit dieser oder einer anderen Correctur festgestellt worden ist. Dieses erscheint aber fast unmöglich, denn erstens sind wohl die erhaltenen Mutterlaugen in vielen Fällen übersättigte Lösungen, und zweitens wechseln die durch das Waschwasser gelösten Mengen Harnsäure nicht nur mit der auf dem Filter anwesenden Menge, sondern noch mehr mit den wechselnden physikalischen Eigenschaften der aus dem Harn abgeschiedenen Harnsäure. Bisweilen bekommt man nämlich grosse schöne Krystalle, die nur wenig durch 35 bis 75 ccm. Waschwasser gelöst werden, in vielen Fällen aber erhält man äusserst kleine, stark gefärbte, kaum krystallinische Harnsäurepartikelchen, die man nicht ohne erhebliche Verluste bis zur Chlorfreiheit waschen kann.

Nach einigen von uns hierüber angestellten Versuchen wurde einmal 1,5 mg in 100 ccm. Waschwasser gefunden, ein anderes Mal sogar 4 mg Harnsäure in 100 ccm. Waschwasser. Im letzten Falle war nach dem Waschen nur 27,6 mg Harnsäure auf dem Filter vorhanden. Der Verlust an Harnsäure durch 100 ccm. Waschwasser war demnach beinahe 13%.

#### Die Ammonsalzmethode.

Das von Folin angegebene Verfahren zur Bestimmung der Harnsäure im Harn ist folgendes:

Zu 100 ccm. Harn werden 10 g Ammonsulfat und einige Tropfen Ammoniak zugesetzt. Nach 2stündigem Stehen wird filtrirt und das abgeschiedene Ammonurat direkt durch Kaliumpermanganat titirt.

Dieses Verfahren liefert bei vielen Harnen Resultate, die mit den nach Salkowski oder Hopkins erhaltenen sehr gut stimmen. Aber die Methode ist nicht als zuverlässig anzusehen, weil derselben zwei Fehlerquellen anhaften, die sich zwar bei einer grossen Anzahl von Harnen fast genau ausgleichen, aber trotzdem als unzulässige Fehlerquellen gelten müssen.

Die eine von diesen Fehlerquellen liegt in der schon von Wörner erwähnten Thatsache, dass zwei Stunden unter den obigen Bedingungen nicht genügen, um alle Harnsäure als Ammonurat auszufällen. Nach längerem Stehen bilden sich weitere Fällungen, die zwar nicht, wie Wörner angibt, aus Uraten bestehen, sondern aus Phosphaten, denen Spuren von Uraten beigemengt sind.

Wörner hat übrigens die Frage über die Fällbarkeit der Harnsäure durch Ammonsalze nur in ganz oberflächlicher Weise behandelt. Auf Seite 72 seiner Abhandlung hat er die Folin'schen Angaben in folgender Weise kritisirt: «Es lag aber bereits eine Mittheilung von A. Edmunds vor, dass Ammonsulfat Harnsäure durchaus nicht so rasch und vollständig ausfällt, eine Beobachtung, die ich nur bestätigen kann. Folin geht über Edmunds Angaben mit den Worten hinweg: [Edmunds fand, dass Sättigung mit Ammonsulfat eine vollständige Fällung nur nach mehrtägigem Stehen bewirke und dass Halbsättigung mit demselben Salze überhaupt keine Fällung erzeuge.]»<sup>1)</sup> Dies Resultat scheint mir (Folin) so wenig im Einklang mit dem, was bei der Natur der Reaction erwartet werden sollte, dass ich glaubte, dasselbe bis auf Weiteres vernachlässigen zu können.» Gleich darauf, S. 74, sagt nun Wörner: «Es geht aus diesen

---

<sup>1)</sup> Der in Klammern enthaltene Satz wurde hier aus dem Originalartikel beigelegt, doch hat Wörner denselben nicht citirt.

(Wörner's) Bestimmungen mit Sicherheit hervor, dass erst ein Zusatz von 30%igem Ammonsulfat die Harnsäure rasch und völlig zur Abscheidung bringt<sup>1)</sup>. Wörner scheint keine Ahnung zu haben, dass er somit die oben citirten, gegen Edmunds gerichteten Bemerkungen Folin's in vollständigster Weise bestätigt hat, denn 30%iges Ammonsulfat bedeutet ja noch nicht einmal eine halbgesättigte Lösung.<sup>1)</sup>

Uebrigens scheinen auch die Wörner'schen Resultate bisweilen ungenau zu sein.

Auf Seite 73 gibt er an, dass er durch Ausfällung mit 10%igem Ammonsulfat aus 150 ccm. desselben Harns 2,94, 5,46, 71,82 und 81,90 mg Harnsäure, also eine Differenz von etwa 89 mg Harnsäure, erhalten hat. Bei mehreren hundert, im letzten Jahre mit Hilfe von 10%igem Ammonsulfat ausgeführten Harnsäurebestimmungen haben wir nie eine Differenz von mehr als 3 mg Harnsäure zwischen Parallelbestimmungen mit demselben Harn gefunden, und im Mittel betragen unsere Differenzen sicher nicht mehr als 1 mg Harnsäure pro 100 ccm. Harn. Da die Wörner'schen Resultate indessen nach seiner neuen Methode und nicht nach Hopkins oder nach Folin erhalten wurden, so müssen sie wohl auf seine eigene Methode zurückgeführt werden.

Dass durch 10%iges Ammonsulfat nach 2stündigem Stehen nicht immer alle Harnsäure aus Harn herausgefällt wird, wie dies Wörner angibt, ist aber richtig. Durch weiteres Stehen wird oft noch 2 bis 4 mg Harnsäure erhalten. Diese Schwierigkeit lässt sich nicht ohne Zusatz von sehr viel grösseren Mengen Ammonsulfat (oder andere Ammonsalze) beseitigen. Dies ist aber nicht zu empfehlen, weil aus solchen concentrirten Lösungen es äusserst schwierig ist, vollständig klare Filtrate zu erhalten, und auch, weil andere Substanzen bei vielen Harnen dadurch mit der Harnsäure ausgefällt werden. Wörner's Angabe (l. c. S. 74), dass letzteres bei Anwendung von 20%igem Ammonchlorid nicht der Fall ist, ist nicht richtig. Als Resultat einer grossen Anzahl, in verschiedenen Richtungen an-

---

1) Comey's Dictionary, S. 57; Solubilities, S. 414.

gestellter Versuche sind wir zu der Schlussfolgerung gekommen, dass 10%iges Ammonsulfat und 12 bis 24stündiges Stehen das zweckmässigste Verfahren ist, um die Harnsäure des Harns so zu fällen, dass sie ohne Weiteres titirt werden kann. Andere Ammonsalze, wie das Chlorid, das Acetat, das Carbonat, das Bicarbonat und das Phosphat, sowie auch Mischungen von verschiedenen dieser Salze, wurden auf ihre Brauchbarkeit untersucht; das Sulfat hat sich aber als das geeignetste bewährt. Nach den Erfahrungen Jolles' ist das Ammonacetat dem Sulfat wie auch dem Chlorid vorzuziehen, offenbar weil das Ammonacetat nach 2 bis 3stündigem Stehen fast immer schnell ablaufende, ganz klare Filtrate liefert, während andere Ammonsalze, besonders das Carbonat und das Sulfat, dies nicht immer thun. Hätte Jolles das in letzter Zeit von uns angewandte Ammonphosphat in seine Untersuchungen hineingezogen, so würde er wahrscheinlich dieses Salz als noch besser als das Acetat gefunden haben, denn es gibt immer sehr klare Filtrate. Diese Verschiedenheiten bei dem Filtriren machen sich aber kaum bemerkbar, wenn man die Harnproben bis zum folgenden Tage stehen lässt.

Die Thatsache, dass die harnsäurefällende Wirkung der Ammonsalze bisweilen nach 2 bis 3 Stunden nicht ganz vollendet ist, scheint ebenso wie Folin übrigens auch Jolles entgangen zu sein, denn er erwähnt ausdrücklich, dass keine weiteren Fällungen in seinen Filtraten entstanden seien. Wahrscheinlich hat Jolles dabei ganz wie Folin nicht eine genügend grosse Anzahl Filtrate bis am folgenden Tage stehen lassen, denn sonst würde auch er sicher obige Thatsache beobachtet haben.

Die Jolles'sche Abhandlung enthält noch ein paar Angaben über die Ausfällung der Harnsäure als Ammonurat, die einer Berichtigung bedürfen. Nach Zusatz von Ammonsalz und Ammoniak lässt Jolles den Inhalt des Becherglases  $2\frac{1}{2}$  bis 3 Stunden stehen, «während welcher Zeit mit dem Glasrohr öfters umgerührt wird». Das Umrühren ist nach unseren Erfahrungen jedoch ganz unzulässig, weil dadurch das ausfallende Ammon-

urat so fein vertheilt wird, dass es sich nicht am Boden des Becherglases absetzt und nachher auch durch das beste Filtrirpapier geht und die Poren desselben verstopft. Im Gegentheil soll nur möglichst wenig umgerührt werden, d. h. nur bis alles zugesetzte Salz aufgelöst ist und das Ammonurat sich abzuscheiden beginnt. Wird in dieser Weise verfahren, dann setzt sich das Ammonurat sehr gut am Boden des Becherglases ab und man kann später bei der Filtration fast die ganze Menge der obenstehenden Flüssigkeit zuerst durch das Filter fließen lassen und so das Filtriren und das nachherige Auswaschen des Ammonurates sehr beschleunigen.

Die weitere Angabe von Jolles, dass man dem Harne neben dem Ammonsalz nur einige Tropfen Ammoniak zusetzen darf, weil durch mehr Ammoniak grössere Mengen von Phosphaten ausgefällt werden, die dann das Filtriren bezw. das Auswaschen des Urates erschweren, ist ebenfalls irrthümlich und wohl nur als ein Versehen Jolles' zu betrachten, denn die Menge der aus ammoniakalisch gemachten Harnen ausfallenden Phosphate beruht nur auf den im Harn vorhandenen Mengen Calcium und Magnesium, die mit Phosphorsäure unlösliche Salze zu geben vermögen. Die von Jolles gefundenen Schwierigkeiten bei der Filtration sind, wie oben bemerkt, auf sein öfteres Umrühren der Harnproben nach dem Auflösen des Ammonsalzes zurückzuführen.

Ueber die Anwendung des Ammoniaks bei der Ausfällung der Harnsäure als Ammonurat lassen sich folgende Beobachtungen aus unseren Versuchen entnehmen: Gelöste Harnsäure wird ziemlich rasch durch Stehen mit Ammoniak allein zersetzt, ganz wie durch die stärkeren Alkalien. So wurde z. B. eine reine Harnsäurelösung von 73 mg durch Zusatz von 10%igem concentrirten Ammoniak und 18ständiges Stehen bis auf 21,6 mg Harnsäure pro 100 ccm. Lösung zerstört. Bedeutende Mengen Ammoniak + Ammonsalz zersetzen aber Harnsäure nicht, denn ein Zusatz von 10%igem Ammonsulfat und einem Zehntel Volumen 10%iger Ammoniaklösung zur obigen Harnsäurelösung hatte nach 48ständigem Stehen keine Harnsäure zersetzt. Ein mässiger Ueberschuss an Ammoniak befördert

die Ausfällung wie das Abfiltriren der Harnsäure. Bei sehr sauer reagirenden Harnen wird die Harnsäure bisweilen erst durch 10%iges Ammonsulfat gefällt, wenn man den Harn durch Ammoniak alkalisch gemacht hat. Als Hauptergebniss unserer hierüber gemachten Erfahrungen ist anzugeben, dass ein Zusatz von 10 ccm. 10%igen oder 3 bis 4 ccm. concentrirten Ammoniaks zu 100 ccm. Harn zweckmässiger ist als die kleineren Mengen Ammoniak, die früher von Folin wie von Jolles bei den Harnsäurebestimmungen angewandt worden sind.

Die Jolles'sche Arbeit enthält eine Nachprüfung der Folin'schen Methode. Die nach Folin gefundenen Werthe wurden dabei in üblicher Weise mit anderen nach Ludwig-Salkowski erhaltenen Resultaten verglichen. Aus 20 Harnen, also aus 2 Liter Harn von verschiedener Herkunft wurden dabei durch das Ammonacetatverfahren 1,057 g Harnsäure, nach Ludwig-Salkowski 0,975 g Harnsäure gefunden. Somit ergibt sich, dass Jolles im Mittel 4 mg Harnsäure mehr pro 100 ccm. Harn nach Hopkins-Folin als nach Ludwig-Salkowski gefunden hat. Das Verfahren Jolles', diese Differenzen auch als Procente darzustellen, erscheint uns jedoch nicht sachgemäss, denn man kann gerade so gut übereinstimmende Resultate aus Harnen mit hohem, wie aus Harnen mit niedrigerem Harnsäuregehalt bekommen. Dies wird ersichtlich, wenn man z. B. aus der Jolles'schen Tabelle<sup>1)</sup> Harn 2 und Harn 17 vergleicht: bei Harn 2 wurde eine Differenz von 2 mg, bei Harn 17 eine Differenz von 3 mg Harnsäure gefunden; als Procent berechnet werden nun diese Differenzen in dem einen Fall als 4 in dem anderen Fall als 9% wiedergegeben.

Die von Jolles erhaltenen Resultate sind indessen annähernd dieselben, wie wir sie bei einer ganzen Reihe von Harnen nach dem ursprünglichen Folin'schen Verfahren erhalten haben, d. h. bis zu 7 mg, im Mittel etwa  $3\frac{1}{2}$  mg mehr als die nach Salkowski oder Hopkins erhaltenen Werthe. Aus unserem Protokoll, das eine grosse Anzahl solcher Analysen

---

1) l. c. S. 228.

enthält, werden einige direkt auf einander folgende entnommen, um diesen Punkt zu beleuchten. Dabei sei zu bemerken, dass bei den «nach Folin» gemachten Versuchen der filtrirte Harn nach Zusatz von Ammonsalz und Ammoniak bis am nächsten Tage stehen gelassen und darauf das abgeschiedene Ammonurat direkt titirt wurde. Bei den «nach Hopkins» ausgeführten Versuchen wurde der Harn nur 2 bis 3 Stunden stehen gelassen und die in dem Ammonurat enthaltene Harnsäure vor der Titration durch Säurezusatz und 24stündiges Stehen abgeschieden. Bei den «nach Salkowski» gemachten Parallelbestimmungen wurden die Phosphate vor dem Silbernitratzusatz abfiltrirt. Eine Correctur für die Löslichkeit des Ammonurates oder der freien Harnsäure wurde nicht benutzt, die Mutterlauge und das Waschwasser wurden aber immer genau abgemessen.

Bisweilen wurde die Harnsäure nach Folin durch Zusatz kleiner Mengen Ammonsalz ausgefällt und die Harnsäure darauf nach Hopkins durch Säurezusatz und 24stündiges Stehen abgeschieden. Dieses Verfahren wird mit den Worten «nach Hopkins-Folin» bezeichnet.

Die Menge des angewandten Harnes betrug für jede Bestimmung 100 ccm.

#### 1. Gemischter Harn. (Normal.)

Nach Folin Harn + 7% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ergab	47,2 mg Harnsäure.
„ „ „ + 7% $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	„	48,0 „
„ „ „ + 7% Ammonphosphat	„	47,2 „
Nach Salkowski (Mutterl. + Waschw. = 40 ccm.)	„	46,2 „
„ „ ( „ + „ = 60 „ )	„	46,2 „
„ „ ( „ + „ = 50 „ )	„	46,0 „
„ „ ( „ + „ = 30 „ )	„	47,0 „

#### 2. Gemischter Harn. (Normal.)

Nach Folin Harn + 7% Ammonphosphat	ergab	61,8 mg Harnsäure.
„ „ „ + 7% „	„	62,2 „
„ „ „ + 12% „	„	61,8 „
„ „ „ + 12% „	„	60,3 „
Nach Hopkins (Mutterl. + Waschw. = 40 ccm.)	„	57,6 „
„ „ ( „ + „ = 40 „ )	„	57,6 „
Nach Hopkins-Folin 12% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Mutterl. + Waschw. = 40 ccm.)	„	55,7 „

Nach Hopkins-Folin 7% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		ergab 58,1 mg Harnsäure.
(Mutterl. + Waschw. = 40 ccm.)		
Nach Salkowski (Mutterl. + Waschw. = 40 ccm.)	> 54,0	>
( > + > = 40	> 57,5	>

### 3. Normaler Harn eines Irrenkranken.

Spezifisches Gewicht 1,020. Tagesmenge 800 ccm.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		ergab 57,0 mg Harnsäure.
> > > + 10% Ammonphosphat	> 56,2	>
> > > + 20%	> 54,3	>
Nach Hopkins (Mutterl. 15 ccm. + Waschw. 28 ccm.)	> 53,4	>
> > > ( > 8 > + > 37 > )	> 53,4	>
Nach Salkowski ( > 14 > + > 44 > )	> 49,8	>
> > > ( > 10 > + > 25 > )	> 53,3	>

### 4. Harn eines Irrenkranken.

Spezifisches Gewicht 1,030. Tagesmenge 800 ccm.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		ergab 90,0 mg Harnsäure.
> > > + 10% Ammonphosphat	> 88,2	>
> > > + 20%	> 87,0	>
Nach Hopkins (Mutterl. 18 ccm. + Waschwasser 30 ccm.)	> 83,0	>
> > > ( > 10 > + > 35 > )	> 81,4	>
Nach Salkowski ( > 14 > + > 30 > )	> 81,7	>
> > > ( > 26 > + > 50 > )	> 80,3	>

### 5. Harn eines Irrenkranken.

Spezifisches Gewicht 1,0045. Tagesmenge 2080 ccm.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		ergab 15,3 mg Harnsäure.
Nach Hopkins-Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
(Mutterl. 7 ccm. + Waschw. 40 ccm.)	> 12,1	>
Nach Hopkins (Mutterl. 13 ccm. + Waschw. 25 ccm.)	> 13,0	>
> > > ( > 5 > + > 30 > )	> 13,7	>
Nach Salkowski ( > 8 > + > 43 > )	> 13,0	>
> > > ( > 6 > + > 50 > )	> 13,0	>

### 6. Fieberharn. (Grippe).

Spezifisches Gewicht 1,033. Tagesmenge 1080 ccm.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		ergab 72,3 mg Harnsäure.
Nach Hopkins-Folin Harn + 10%		
(Mutterl. 9 ccm. + Waschw. 50 ccm.)	> 68,3	>
Nach Salkowski (Mutterl. 30 ccm. + Waschw. 50 ccm.)	> 67,6	>



### 7. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,024. Tagesmenge 500 ccm.

Nach Folin Harn + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ergab 65,8 mg Harnsäure.
Nach Hopkins-Folin + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Mutterl. 20 ccm. + Waschw. 30 ccm.)	61,1

### 8. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,020.

Nach Folin Harn + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ergab 24,0 mg Harnsäure.
Nach Hopkins (Mutterl. 18 ccm. + Waschw. 30 ccm.)	20,8
„ „ ( „ 12 „ + „ 32 „ )	20,8
Nach Salkowski ( „ 9 „ + „ 34 „ )	20,8

### 9. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,024.

Nach Folin Harn + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ergab 55,9 mg Harnsäure.
Nach Hopkins (Mutterl. 8 ccm. + Waschw. 28 ccm.)	52,5
Nach Salkowski ( „ 11 „ + „ 37 „ )	52,1
„ „ ( „ 15 „ + „ 48 „ )	52,7

### 10. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,0245.

Nach Folin Harn + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ergab 48,9 mg Harnsäure.
Nach Hopkins (Mutterl. 7 ccm. + Waschw. 38 ccm.)	45,6
Nach Salkowski ( „ 10 „ + „ 40 „ )	49,3
„ „ ( „ 11 „ + „ 40 „ )	48,6

### 11. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,0145.

Nach Hopkins (Mutterl. 8 ccm. + Waschw. 30 ccm.)	ergab 36,4 mg Harnsäure.
Nach Salkowski ( „ 25 „ + „ 30 „ )	36,4
„ „ ( „ 18 „ + „ 22 „ )	37,1

### 12. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,0205.

Nach Folin Harn + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	ergab 36,0 mg Harnsäure.
Nach Hopkins-Folin + 10% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Mutterl. 12 ccm. + Waschw. 30 ccm.)	33,4
Nach Hopkins (Mutterl. 18 ccm. + Waschw. 28 ccm.)	33,7
„ „ ( „ 14 „ + „ 34 „ )	35,3
Nach Salkowski ( „ 17 „ + „ 40 „ )	33,5
„ „ ( „ 10 „ + „ 48 „ )	33,8

### 13. Gemischter Harn.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ergab	50,2 mg Harnsäure.
Nach Hopkins-Folin 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		
(Mutterl. 14 ccm. + Waschw. 30 ccm.)	>	48,4 > >
Nach Hopkins. (Mutterl. 15 ccm. + Waschw. 26 ccm.)	>	49,1 > >
„ „ ( > 9 > + > 32 > )	>	48,0 > >
Nach Salkowski ( > 9 > + > 40 > )	>	47,6 > >
„ „ ( > 8 > + > 30 > )	>	46,3 > >

### 14. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,030.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ergab	24,0 mg Harnsäure.
Nach Hopkins (Mutterl. 13 ccm. + Waschw. 30 ccm.)	>	20,8 > >
„ „ ( > 12 > + > 32 > )	>	20,8 > >
Nach Salkowski ( > 9 > + > 34 > )	>	20,8 > >

### 15. Harn eines Irrenkranken.

Specificsches Gewicht 1,024.

Nach Folin Harn + 10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	ergab	55,9 mg Harnsäure.
Nach Hopkins (Mutterl. 8 ccm. + Waschw. 28 ccm.)	>	52,5 > >
Nach Salkowski ( > 15 > + > 48 > )	>	52,7 > >

Die obenstehenden Resultate stimmen somit mit denen von Jolles erhaltenen überein. Da aber Jolles seine Harnproben nur 2—3 Stunden vor dem Filtriren stehen liess, so ist dies eigentlich auf den ersten Blick befremdend, denn gleich den früheren Folin'schen hätten seine Resultate niedriger ausfallen sollen. Dass dies nicht der Fall ist, liegt wohl daran, dass Jolles seine Harne nicht immer filtrirte. Wir werden auf die Nothwendigkeit des Filtrirens weiter unten zu sprechen kommen. Zuerst sei es uns gestattet, den Grund zu erörtern, weshalb unsere Resultate etwas höhere Werthe ergaben, als die nach Salkowski oder Hopkins erhaltenen.

Wir machten im Laufe unserer Untersuchungen die Erfahrung, dass es bei manchen Harnen einfach unmöglich war, die nach Salkowski oder Hopkins ermittelten Werthe durch direktes Titiren der Ammonsalzefällungen zu erhalten. Von demselben Individuum stammende Harne ergaben an einigen Tagen richtige, an anderen durchaus zu hohe Resultate. Es war somit nicht zu leugnen, dass es viele pathologische, wie auch anscheinend normale Harne gibt, die einen Körper ent-

halten, der wie Harnsäure durch geringe Mengen Ammonsalz gefällt wird und auch das Kaliumpermanganat reducirt. Da es sich weiter ergab, dass blosses Filtriren des Harnes vor der Ausfällung der Harnsäure den hierdurch entstehenden Fehler, auch bei den klarsten Harnen, immer verminderte, so wurde angenommen, dass es sich um die von K. Mörner erwähnte Mucoids substanz handelte, die auch bei anscheinend klaren Harnen in colloider Lösung vorhanden sein konnte. Inwieweit diese Annahme richtig ist, entzieht sich bislang der Beurtheilung. Ein Mittel war aber schliesslich gefunden, durch welches die Substanz vor der Ausfällung der Harnsäure entfernt werden konnte. Der Körper ist nämlich durch die anzuwendenden Mengen Ammonsalz bei saurer Reaction fällbar. Setzt man etwa 1 ccm. 10%iger Essigsäure neben 10 g Ammonsalz 100 ccm. Harn zu, so entsteht sogleich bei solchen Harnen eine flockige, wegen ihrer Durchsichtigkeit schwer sichtbare Fällung, bestehend aus eben diesem Körper. Da es sich bei unseren Untersuchungen nur um das Wegschaffen dieses störenden Körpers handelte, und da er weiter in nur ganz geringen Mengen vorhanden ist, so wurde er nicht näher studirt. Immerhin können einige Angaben darüber gemacht werden. Er gibt die Biuretreaction, ist in Alkalien löslich, in verdünnten Säuren unlöslich. Nach Kochen desselben mit verdünnter HCl konnte keine kupferoxyd reducirende Wirkung festgestellt werden; die angewandte Menge war aber möglicher Weise zu gering, um hierüber sichere Resultate zu ergeben. Ferner sei bemerkt, dass die Substanz sehr schwer abzufiltriren ist, denn selbst eine geringe Menge derselben verstopft die Poren des Filters fast vollständig. Die Anwesenheit dieses Körpers erklärt nun, warum Hopkins und nach ihm Ritter das aus Harn durch Ammonchlorid erzeugte Ammonurat in keiner Weise titrirungsfähig erhalten konnten, denn durch Sättigung mit Ammonchlorid, besonders ohne Zusatz von Ammoniak, wird derselbe anscheinend quantitativ gefällt.

Um nun diesen Körper vor der Abscheidung der Harnsäure zu entfernen, ist es vortheilhaft, neben ihm auch eine andere Fällung in dem Harn zu erzeugen, um das Abfiltriren

zu erleichtern. Eine solche, selbst gut abfiltrierende, bei saurer Reaction entstehende Fällung von Uranphosphat wird durch Zusatz von etwas Uranacetat erzeugt.

Die Ammonsulfatmethode der Harnsäurebestimmung hat sich daher in folgender Weise gestaltet: 500 g Ammonsulfat, 5 g Uranacetat und 60 ccm. 10%iger Essigsäure werden durch Zusatz von 650 ccm. Wasser gelöst. Das Volumen der so erhaltenen Lösung ist fast genau 1 Liter. 75 ccm. obiger Lösung wird mit 300 ccm. Harn in einer Flasche von 500 ccm. Inhalt gemischt. Um dem Niederschlag Zeit zum Absetzen zu geben, wird die Mischung 5 Minuten stehen gelassen, alsdann durch zwei Faltenfilter filtrirt und je 125 ccm. der Filtrate in zwei Bechergläser abgemessen. Diesen Filtraten werden nun 5 ccm. concentrirten Ammoniaks beigesetzt und nach etwas Umrühren wird die Lösung bis zum nächsten Tage weggestellt. Von dem nun immer am Boden des Becherglases abgesetzten Ammonurat wird die obenstehende Flüssigkeit vorsichtig auf ein Filter (Schleicher und Schüll Nr. 597) gegossen, zuletzt die Fällung mittelst 10%iger Ammonsulfatlösung auf das Filter gespült und einige Mal gewaschen. Spuren von Chloriden stören die Titration nicht und das ganze Filtriren und Auswaschen kann in obiger Weise in 20—30 Minuten beendet werden. Bei dem Zurückspülen des Urates in das Becherglas empfiehlt es sich, das Filter zuerst aus dem Trichter zu nehmen und zu öffnen, anstatt dasselbe nur mit dem Glasstabe zu durchstossen. Dem Ammonurat, in annähernd 100 ccm. Wasser aufgeschlemmt, wird 15 ccm. concentrirte Schwefelsäure zugesetzt und die erhaltene Lösung sogleich titirt. Gegen das Ende der Titration ist es zweckmässig, die Kaliumpermanganatlösung in Portionen von je zwei Tropfen hineinfließen zu lassen, bis die erste schwache Rosafärbung durch die ganze Flüssigkeit zu sehen ist. Jeder Cubikcentimeter  $n/_{10}$ -Permanganatlösung entspricht 3,75 mg Harnsäure.<sup>1)</sup> Eine

---

1) Da die Titration der Harnsäure sich wohl immer als das bequemste Verfahren zur Bestimmung derselben bewahren wird, welche Methode zur Isolirung der Harnsäure man auch anwende, so sollen noch einige Bemerkungen hierüber beigelegt werden. Die Bedenken Ritter's

Correctur von 3 mg Harnsäure pro je 100 ccm. des angewandten Harns ist wegen der Löslichkeit des Ammonurates hinzuzufügen.

Bei den unten hinzuzufügenden Harnsäurebestimmungen wurde die anzuwendende Correctur nicht beigegeben, um die Vergleichung der direkt nach obiger Methode erhaltenen Zahlen mit den nach Salkowski erhaltenen zu erleichtern. Inwiefern die angegebene Correctur der Löslichkeit des Ammonurates bei Harnen genau entspricht, erscheint uns fast unmöglich, festzustellen. Die Löslichkeit des Ammonurates aus reinen Harnsäurelösungen entspricht 1,5 mg pro 100 ccm. Lösung. Bei Harnen erscheint diese Löslichkeit etwas grösser zu sein und wir haben die anzuwendende Correctur als 3 mg pro 100 ccm. Harn vorgeschlagen. Die Gründe hierfür sind folgende: In grösseren Mengen von aus Harnen erhaltenen Ammonsulfatfiltraten wurde die Harnsäure nach Salkowski bestimmt. Diese Silberniederschläge enthalten neben Harnsäure und den bekannten Alloxurbasen auch einen unbekannten Körper, der das Kaliumpermanganat reducirt. Da aus einem Liter Harnfiltrat bedeutende Mengen dieses Körpers und nur wenig Harnsäure zuletzt in etwa 20—30 ccm. Flüssigkeit erhalten werden, so ist es gar nicht sicher, ob die auskrystallisierende Harnsäure nicht durch bedeutende Mengen dieses unbekannten Körpers verunreinigt ist und ob nicht die erhaltenen Harnsäuremengen etwas zu hoch ausfallen. Aus 1000 ccm. Harnfiltrat wurde indessen zweimal 27 mg Harnsäure und aus 700 ccm. 17 mg Harnsäure erhalten. In jedem Falle betrug

---

und nach ihm Mörner's, dass das Wägen doch der Titration, wegen der Zersetzlichkeit der Permanganatlösungen bei einzelnen Harnsäurebestimmungen, vorzuziehen sei, sind kaum berechtigt. Die Untersuchungen Morse's (American Chemical Journal, Bd. 18, S. 401; Bd. 20, S. 521) haben ja gezeigt, dass reine Kaliumpermanganatlösungen sich Monate lang unverändert halten. Ferner hielt sich Oxalsäure, durch die man den Titer der Permanganatlösung in einigen Minuten feststellen kann, in normaler Lösung sehr lange Zeit unverändert. Uebrigens können zu jeder Zeit Permanganatlösungen frisch bereitet und dieselben für klinische Zwecke ohne Feststellung des Titors benutzt werden, wenn man reine Kaliumpermanganatpräparate, wie z. B. Kahlbaum's, benutzt.

die Mutterlauge + Waschwasser 60 ccm. Wenn wir demgemäss den Harnsäuregehalt des Ammonsulfatfiltrates als 3 mg pro 100 ccm. anschlagen, so entspricht dies dem aus einer grossen Anzahl Harnen enthaltenen Mittelwerth und da es sich ferner in diesem Falle nur um gesättigte Mutterlaugen und nicht auch um Waschflüssigkeiten handelt, wie dies bei der Salkowski'schen Correctur der Fall ist, so ist wohl die Annahme berechtigt, dass diese Correctur auch ziemlich constant sein muss.

Bei den folgenden Harnsäurebestimmungen wurde die Salkowski'sche Methode immer in der Weise abgeändert, dass die Phosphate zusammen mit den Silberverbindungen ausgefällt werden. Die Zersetzung des Silberniederschlags durch  $H_2S$  wurde in oben beschriebener Weise unter Zusatz von etwas Kupfersulfat ausgeführt. Das Ammonsulfatverfahren wurde, wie oben geschildert, ausgeführt und dabei wie zuvor die anzuwendende Correctur von 3 mg Harnsäure zwecks leichter Vergleichung nicht berechnet.

Art der Harn	Harnsäure in mg nach der Ammon- sulfat- methode	Nach Salkowski	
		Harnsäure in mg	Mutterlauge + Wasch- wasser
1 Pneumonieharn, eiweisshaltig . . . .	33,2	34,5	70 ccm.
		33,7	80 „
2 Fieberharn, allgemeine Tuberculose .	47,3	46,9	65 „
3 Fieberharn . . . . .	59,3	58,1	83 „
4 Fieberharn, croupöse Pneumonie . .	31,9	33,7	50 „
5 Fieberharn, tuberculöse Peritonitis .	43,8	43,5	80 „
6 Diabetes mellitus. Allgemeine Paralyse	26,6	26,4	60 „
		25,6	85 „
7 Pneumonieharn . . . . .	77,6	78,0	80 „
8 Pneumonieharn . . . . .	53,3	53,7	80 „
9 Fieberharn . . . . .	50,9	50,5	70 „
		50,9	80 „
10 Fieberharn . . . . .	48,7	47,6	60 „
		48,7	65 „
11 Fieberharn, stark gefärbt . . . . .	104,2	103,4	75 „
		102,3	80 „

Art der Harn e		Harnsäure in mg nach der Ammon- sulfat- methode	Nach Salkowski	
			Harnsäure in mg	Mutterlauge + Wasch- wasser
12	Fieberharn, stark gefärbt . . . . .	18,8	18,5 17,4	60 ccm. 50 „
13	Fieberharn. Gelenkrheumatismus . .	50,6	50,6 51,3	80 „ 80 „
14	Fieberharn. Phthisis . . . . .	22,5	24,0 23,6	80 „ 70 „
15	Septische Endometritis . . . . .	66,7	66,4	80 „
16	Normaler Harn, stark gefärbt . . . .	51,9	51,0 51,4	60 „ 80 „
17	Normaler Harn . . . . .	32,7	32,9 32,6	70 „ 80 „
18	Gemischter Harn . . . . .	51,5	51,6	90 „
19	Icterischer Harn, sehr stark gefärbt. (Icterische Harn e müssen zuerst durch Zusatz von etwas Eiweisslösung und Aufkochen entfärbt werden.)	24,4	25,1	60 „

### Ueber die Methoden von Mörner und Jolles.

Als Anhang dieser Arbeit sollen noch einige Bemerkungen über die zwei neuen, von Mörner und Jolles angegebenen Methoden zur Bestimmung der Harnsäure beigelegt werden.

Nach Mörner wird die Harnsäure durch Ammonchlorid gefällt; das Ammoniak des Wassers wie das des Ammonchlorids wird durch kochende Natronlauge entfernt und die in Lösung zurückbleibende Harnsäure nach Kjeldahl als Ammoniak bestimmt. Inwiefern dieses Verfahren bequemer als das ursprüngliche Hopkins'sche sein soll, ist nicht ersichtlich; jedenfalls ist es ungenauer, denn neben der Harnsäure wird auch der oben beschriebene Eiweisskörper gefällt und bei der Stickstoffbestimmung als Harnsäure berechnet. Die Mörner'sche Angabe, dass Harnsäure durch Erwärmen besser als bei gewöhnlicher Temperatur als Ammonurat ausgefällt wird, können wir nach unseren Erfahrungen auch nicht bestätigen.

Die Jolles'sche Methode zur Bestimmung der Harnsäure beruht, wie die Mörner'sche, auf der Herausfällung der Harnsäure als Ammonurat und der Abtreibung des an die Salze gebundenen Ammoniaks durch kochende Alkalien. Nur benützt Jolles Ammonacetat anstatt Ammonchlorid zur Herausfällung der Harnsäure und Magnesiumoxyd anstatt Natronlauge zur Abtreibung des Ammoniaks. Anstatt die Harnsäure nach Kjeldahl zu Ammonsulfat zu oxydiren, oxydirt Jolles zu Harnstoff unter Anwendung von kochendem Kaliumpermanganat und Schwefelsäure. Der Harnstoff wird darauf durch Natriumhypobromit zersetzt und die Harnsäure aus dem erhaltenen Volumen Stickstoff berechnet.

Die Jolles'sche Angabe, dass Harnsäure durch kochendes Kaliumpermanganat und Schwefelsäure quantitativ in Harnstoff gespalten wird und dass dabei kein Ammonsulfat entsteht, erscheint uns etwas zweifelhaft, denn selbst, wenn auch nur Harnstoff ausschliesslich zuerst geformt wurde, so wird derselbe doch durch kochende, verdünnte Mineralsäure zum Theil in Ammoniak und Kohlensäure gespalten. Es ist übrigens nicht ersichtlich, warum Jolles solch Gewicht auf die Spaltung der Harnsäure nur bis zu Harnstoff legt, denn Ammoniak wird ja vollständiger als Harnstoff durch Natriumhypobromit in Wasser und Stickstoff gespalten.<sup>1)</sup>

Uebrigens ist aber auch die Zersetzung des Harnstoffs durch Natriumhypobromit so ungenau, dass die auf diesem Princip beruhenden Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs im Harn jetzt wohl überhaupt nur für klinische Zwecke, wo es sich nicht um eine besondere Genauigkeit handelt, gebraucht werden. Diese Bedenken gegen das Jolles'sche Verfahren werden aber noch schwerwiegendere, wenn man noch andere Bedingungen, unter denen er arbeitet, in Mitrechnung zieht.

---

<sup>1)</sup> In dem chemischen Laboratorium des «Mc Lean Hospital» wird Harnstoff bisweilen in der Weise bestimmt, dass der nach Mörner und Sjöquist oder nach Krüger von anderen Stickstoffverbindungen des Harnes isolirte Harnstoff nach Folin durch kochendes Magnesiumchlorid in Ammoniak gespalten und darauf nach Knop und Dietrich als Stickstoff bestimmt wird.



Die Zersetzung des Harnstoffs durch Natriumhypobromit ist nämlich nie quantitativ, ist aber um so unvollständiger, je verdünnter die das angewandte Natriumhypobromit enthaltende Natronlauge ist. Der nach Jolles aus der Harnsäure erhaltene Harnstoff, dessen Menge höchstens dem Harnstoff in etwa 3 bis 4 ccm. normalen Harns entspricht, ist nun aber in 200 bis 250 ccm. Wasser gelöst. Dazu kommt noch, dass Jolles nur 80 g NaOH im Liter, anstatt der üblichen 100 g in 250 ccm. benützt. Die Annahme Jolles', dass bei seiner Methode der Harnstoff quantitativ zersetzt wird, scheint uns unter diesen Umständen weiterer Bestätigung zu bedürfen, auch ist die Thatsache nicht zu vergessen, dass eine relativ sehr beträchtliche Menge Stickstoff in der grossen Quantität Wasser absorbiert wird.

Da wir in letzter Zeit auch mit reinen Harnstofflösungen gearbeitet haben, wurde einmal folgender Versuch angestellt: 20 ccm. 0,47%iger Harnstofflösung wurden durch 25 ccm. Natriumhypobromit unter den üblichen Bedingungen zersetzt. Es wurden erhalten 30,8 ccm. Stickstoff (741 mm., 25°), entsprechend 89,3% des angewandten Harnstoffs. Darauf wurden 20 ccm. derselben Harnstofflösung auf 200 ccm. verdünnt und in derselben Weise durch Zusatz von 25 ccm. Natriumhypobromitlösung zersetzt, in diesem Falle wurden nur 8,6 ccm. Stickstoff erhalten.

---

# Ueber die Entgiftung der Toxine durch die Superoxyde, sowie thierische und pflanzliche Oxydasen.

Von  
N. Sieber.

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des Institutes für experimentelle Medicin  
in Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Mai 1901.)

---

Anlässlich meiner gemeinschaftlich mit Prof. M. Nencki und Frau Dr. Schumoff-Simanowski ausgeführten Untersuchung über die Entgiftung der Toxine durch die Verdauungssäfte<sup>1)</sup> haben wir gefunden, dass allerdings einzelne Toxine wie z. B. das Diphtherie- und Tetanotoxin durch die Verdauungssäfte sehr energisch zerstört werden, sodass ihre Unschädlichkeit bei Verabreichung per os dadurch vollkommen erklärt wird. Andererseits fanden wir bei der Fortsetzung unserer Untersuchung,<sup>2)</sup> dass andere Toxine, wie z. B. das Abrin, von keinem der Verdauungssäfte weder einzeln, noch im Gemisch in dem Maasse verändert werden, dass dadurch ihre Unschädlichkeit bei Verabreichung per os erklärt werden könnte. Es müssen also noch andere Factoren sein, welche im Verdauungscanal die Entgiftung des Abrins bewirken. Um der Frage näher zu treten, habe ich daher die Einwirkung solcher oxydirender Agentien, welche mit den Oxydationsvorgängen im Organismus Analogien haben, auf die Toxine untersucht. Ich wählte dazu das Wasserstoffsuperoxyd und Calciumsuperoxyd. Dieses letztere Salz, dessen Spaltung in Kalk und

---

<sup>1)</sup> Nencki, Sieber und Schumoff-Simanowski, Centralb. für Bacter., erste Abtheil., Bd. 23, S. 840.

<sup>2)</sup> S. Dzierzowski und N. Sieber, Archives des Sciences biologiques, Bd. VIII.

Sauerstoff im Verdauungstractus und den Geweben schon von M. Nencki und J. Zaleski<sup>1)</sup> constatirt wurde, war für meinen Zweck ganz besonders geeignet. Das Calciumsuperoxyd =  $\text{CaO}_2$ , durch Einwirkung von Wasserstoffsuperoxyd auf Kalkwasser dargestellt, ist ein weisses krystallinisches, in Wasser unlösliches Pulver, das 4 Moleküle Krystallwasser enthält. Bei Zimmertemperatur trocken aufbewahrt, hält es sich lange unverändert. Bei der Bruttemperatur dagegen mit Wasser angerührt, zersetzt es sich, wie ich gefunden habe, allmählich unter Entwicklung von Sauerstoff. Als in einem Versuche 5 g Calciumsuperoxyd mit 100 ccm. Wasser übergossen und bei  $37^\circ$  in einem mit Ableitungsröhrchen versehenen Kölbchen aufgestellt wurden, begann schon nach etwa einer viertel bis halben Stunde eine lebhafte Gasentwicklung. Am nächsten Tage, circa 18 Stunden später, wurde eine Probe des entweichenden Gases über Quecksilber aufgefangen und die quantitative Bestimmung ergab, dass das Gas aus 48 Volumprocent Sauerstoff und 52 Volumprocent Stickstoff — von der eingeschlossenen Luft herrührend — bestand.

Lässt man nun Diphtherietoxin-, Tetanotoxin- oder Abrinlösungen vom bekannten Giftwerthe (es sind die 3 Toxine, mit denen ich bis jetzt experimentirte) mit  $\text{CaO}_2$  bei Bruttemperatur stehen, so werden in kurzer Zeit diese 3 Toxine vollkommen entgiftet. So wurde beispielsweise vom Abrin die für Meerschweinchen 20fach tödtliche Dose durch 0,5 g schon in 10 Minuten entgiftet. In anderen Versuchen wurden 5 ccm. Abrinlösung, wovon 0,001 ccm. für Meerschweinchen einfach tödtliche Dose war, durch 0,5 g  $\text{CaO}_2$  innerhalb vier Stunden entgiftet. Ebenso wurden 5,0 ccm. Diphtherie- resp. Tetanotoxinlösung, die 1000fach tödtliche Dose repräsentirend, durch 0,5 g Gorit innerhalb einiger Stunden entgiftet. Kontrollversuche mit gleichen Mengen Kalkhydrat zeigten, dass das letztere den Toxinen gegenüber unvergleichlich weniger wirksam war. Wasserstoffsuperoxyd war insofern für

---

1) Nencki und Zaleski, Diese Zeitschr., Bd. XXVII, S. 487.

meine Versuche ungeeignet, als es für die Thiere selbst bei subcutaner Injection giftig ist. Ich benutzte eine 2%ige Lösung, wovon 1 ccm. = 0,02 g  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Meerschweinchen subcutan injicirt, eine diffuse, harte Schwellung und Entzündung des Unterhautzellgewebes verursachte. Erst die halbe Dose davon, nämlich 0,5 ccm. = 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wurde von den Thieren ohne merklichen Schaden vertragen. Durch 0,5 ccm. dieser  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung wurden 10—100fach tödtliche Abrindosen in 10—15 Minuten, vom Diphtherie- und Tetanotoxin sogar 600fach tödtliche Dosen nach wenigen Stunden entgiftet. Die energische Zerstörung der Toxine durch diese Oxydationsmittel war für mich eine Aufforderung, auch die Wirkung der in der letzten Zeit so eingehend und vielseitig von vielen Autoren wie z. B. von Schönbein, Traube, Pflüger, Schmiedeberg, Jaquet, Salkowski, Spitzer, Medwedeff, Abelous und Biarnès, Bertrand, Bourquelot und viele Anderen mehr untersuchten pflanzlichen und thierischen Oxydasen auf die Toxine zu prüfen.

Nach den Untersuchungen der meisten Autoren ist die Wirkung dieser Oxydasen unabhängig von Lebensprocessen der Zelle. Nach Abelous und Biarnès<sup>1)</sup> wird die oxydirende Eigenschaft dieser Körper durch Erhitzen auf 70° vernichtet. Die Oxydation, welche durch diese Substanzen verursacht wird, ist mit Sauerstoffabsorbtion und  $\text{CO}_2$ -Ausscheidung verbunden. Pepsin, Papaiotin verdauen die Oxydasen nicht. Die Oxydasen gehen nicht durch Pergamentscheidewand hindurch. Als Reagentien, durch welche die Anwesenheit der Oxydasen bewiesen wird, sind: 1. Guajactinctur, 2. Reactiv von Röhmnn und Spitzer (Paraphenylendiamin,  $\alpha$ -Naphtol und Soda), 3. ein Reactiv, bestehend aus wässriger Lösung 1‰ des Metatoluidins und Paraphenylendiamins in alkalischer Lösung und andere mehr. In meinen Versuchen bediente ich mich hauptsächlich der Guajactinctur.

Verschiedene Organe des gleichen Thieres, sowie Organe von verschiedenen Thieren enthalten diese Oxydasen in ver-

---

<sup>1)</sup> Abelous et Biarnès, Comp. rend. de la Société de Biologie, 1896, 1897 und 1898.

schiedenen Quantitäten. Das Gewebe eines jungen Individuums oxydirt viel intensiver als das Gewebe eines alten. Da nach Abelous et Biarnès die Globulinoxydasen durch reines Wasser nicht extrahirbar sind, so schlagen sie dafür vor, die Lösungen von Neutralsalzen als wie: 10%iges  $\text{ClNa}$ , 2%iges Fluornatrium und 8%iges salpetersaures Kali. Slowzow<sup>1)</sup> hat vorgeschlagen, 6%ige Salmiaklösung zum Ausziehen der Oxydase aus der Parotis vom Hunde zu verwenden. Bei meinen Versuchen verwendete ich die Oxydasen aus Milz und Fibrin aus Kalbsblut und der Parotis vom Hunde. Fibrin aus Pferdeblut erwachsener Thiere, wie schon Abelous und Biarnès angeben und ich bestätigt gefunden habe, enthält keine Oxydase. Dagegen erwies sich Fibrin aus dem Blute gegen Diphtherie hoch immunisirter Pferde als sehr reich an Oxydase und auch sehr wirksam gegen die Toxine. Ich komme weiter unten hierauf zurück. Eine pflanzliche Oxydase habe ich aus der Schwarzwurzel dargestellt.

Die Versuche mit den Oxydasen haben nun ergeben, dass sie sehr energisch zerstörend auf das Diphtherie- und Tetanotoxin einwirken. Dagegen war die Entgiftung des Abrins nur eine sehr geringe. Beispielsweise zerstörte 1,0 ccm. nach der im experimentellen Theil angegebenen Vorschrift dargestellter Emulsion aus der Milz, der Parotis, dem Kalbsfibrin die 100—600fache tödtliche Dose des Diphtherie-, 100—200fache des Tetanotoxins, bei Bruttemperatur in wenigen Stunden.

In den meisten meiner Versuche habe ich zwar das Gemisch von Toxin und Oxydase, bevor es den Meerschweinchen injicirt wurde, mehrere bis 24 Stunden im Thermostaten stehen gelassen. Ich habe aber gesehen, dass, wenn das Gemisch von Toxin und Oxydase sofort den Thieren injicirt wurde, auch dann die Entgiftung der Toxine nicht ausblieb. Ich injicirte auch Meerschweinchen und Kaninchen in die eine Körperhälfte die 10—20fache tödtliche Dose des Toxins und sofort darauf in die andere die Oxydase, auch in diesen Versuchen blieben die Thiere am Leben.

---

<sup>1)</sup> Slowzow, Dissertation, russisch. J. 1900.

Zu höchst interessanten Resultaten führten die Versuche mit dem Fibrin normaler und gegen die Diphtherie immunisirter Pferde. Während das Fibrin der ersteren keine direkt Guajactinctur bläuende Oxydase enthält, sondern erst nach Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd bläuende, sogenannte indirekte Oxydase enthält — Linossier's,<sup>1)</sup> ferments oxydants —, erhielt ich bei gleicher Behandlung aus dem Fibrin immunisirter Pferde Extracte, die Guajactinctur sofort intensiv bläuten und auf die Toxine, ebenso wie die Milz oder Parotisextracte vernichtend wirkten. Allgemein war die Oxydasewirkung am intensivsten bei den frisch bereiteten Extracten. Nach einiger Zeit lässt die Wirkung nach. Bemerkenswerth ist es, dass bei Bruttemperatur die Oxydasen länger als bei niedriger Temperatur haltbar sind. Selbstverständlich bei Ausschluss der Fäulniss, wodurch die Oxydasen, ähnlich wie durch höhere Temperaturen, stärkere Säuren und Alkalien, zerstört werden.

### Experimenteller Theil.

Zu den Versuchen mit Calciumsuperoxyd benutzte ich das von der chemischen Fabrik von Heyden Nachfolger in Dresden unter dem Namen «Gorit» käufliche Präparat. Das krystallwasserhaltige Salz, das 4 Moleküle Krystallwasser enthält, sollte, entsprechend der Zersetzungsgleichung  $\text{CaO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{Ca(OH)}_2 + \text{O}$  für je 1 g des Salzes 77 ccm. Sauerstoff, auf 0° und 760 mm. Barometerstand bezogen, liefern. Das käufliche Präparat enthielt weniger Krystallwasser und ergab, mit Jod und unterschwefligsaurem Natron titirt, durchschnittlich 90 ccm. Sauerstoff für 1,0 g des Calciumsuperoxyds. Je ein halbes Gramm des  $\text{CaO}_2$  wurde mit der Toxinlösung, die 10facher bis 1000facher tödtlicher Dose entsprach, vermischt und im Thermostaten 10 Minuten bis 24 Stunden stehen gelassen. Da, wo die Giftdose klein war, wurde sie mit Wasser verdünnt, sodass das Volumen der Flüssigkeit 2—5 ccm. betrug. Nach Verlauf der bestimmten Zeit wurde die Emulsion mit

---

<sup>1)</sup> Linossier, Comp. rend. de la Soc. de Biologie, 1898, p. 373.

etwas Wasser zu einem dünnen Brei angerührt und einem Meerschweinchen subcutan eingespritzt. An der Injectionsstelle entstanden immer subcutane Verhärtungen, von dem nicht gelösten Kalk herrührend, denn selbst in Fällen, wo die Thiere nicht die geringsten specifischen Krankheitserscheinungen zeigten und gleich in den ersten Tagen nach der Injection ihr Körpergewicht zugenommen hatte, waren die Verhärtungen an den Injectionsstellen immer vorhanden.

Wie man aus den nachfolgenden Tabellen ersieht, haben 0,5 g des Calciumsuperoxyds sowohl das Abrin wie das Diphtherie- und Tetanotoxin, auch in den stärksten Giftdosen, mit denen ich experimentirte, nach 24-stündiger, auch kürzerer Einwirkungszeit entgiftet. Wahrscheinlich ist die entgiftende Wirkung noch viel grösser und in meinen späteren Versuchen behalte ich mir vor, die Grenzwirkung des Calciumsuperoxyds zu ermitteln. Die erhaltenen Resultate sind ohne weitere Erklärung aus den nachfolgenden Tabellen ersichtlich.

Tabelle I.  
Einwirkung des Calciumsuperoxyds auf Abrin.  
Tödliche Dose Abrin = 0,001 ccm.

	Zahl der injectirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge des Cal- cium- super- oxyds	Ein- wirkungs- dauer des Calcium- superoxyds auf Abrin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	50 fache	0,5 g	15 St.	350 g	390 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	100 "	0,5 "	20 "	530 "	580 "	
3	200 "	0,5 "	20 "	540 "	570 "	
4	200 "	0,25 "	5 "	370 "	395 "	
5	500 "	0,5 "	4 "	410 "	480 "	
6	500 "	0,25 "	4 "	585 "	630 "	
7	1000 "	0,5 "	4 "	420 "	520 "	
8	1000 "	0,5 "	4 "	320 "	—	Am 5. Tage nach der Injection gestorben an Lungenentzünd.
9	1000 "	0,5 "	4 "	305 "	420 "	
10	2000 "	0,5 "	4 "	600 "	610 "	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
11	3000 "	0,5 "	5 "	400 "	410 "	
12	5000 "	0,5 "	5 "	360 "	380 "	

Tabelle II.

Einwirkung des Calciumsuperoxyds auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der infiltrirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge des Calcium- super- oxyds	Ein- wirkungs- dauer des Calcium- superoxyds auf Diphtherie- toxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 8 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	20 fache	0,5 g	15 St.	440 g	480 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	100 „	0,5 „	20 „	450 „	490 „	
3	200 „	0,5 „	4 „	365 „	420 „	
4	400 „	0,5 „	4 „	560 „	600 „	
5	600 „	0,5 „	4 „	270 „	310 „	
6	1000 „	0,5 „	4 „	400 „	420 „	

Tabelle III.

Einwirkung des Calciumsuperoxyds auf Tetanotoxin.  
Tödliche Dose des Tetanotoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der infiltrirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge des Calcium- super- oxyds	Ein- wirkungs- dauer des Calcium- superoxyds auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 8 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	20 fache	0,5 g	20 St.	380 g	420 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	50 „	0,5 „	20 „	400 „	460 „	
3	100 „	0,5 „	5 „	350 „	390 „	
4	200 „	0,5 „	4 „	300 „	340 „	
5	400 „	0,5 „	4 „	240 „	270 „	
6	600 „	0,5 „	4 „	415 „	450 „	
7	1000 „	0,5 „	4 „	430 „	450 „	

Ich theile hier gleich die Resultate der Versuche mit den Toxinen und Wasserstoffsuperoxyd mit. Wie aus den Tabellen ersichtlich, sind sie viel weniger günstig als wie mit dem Calciumsuperoxyd und bei Anwendung grösserer Mengen von  $H_2O_2$  waren sie noch schlechter.



Tabelle IV.

Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf Abrin.

Tödliche Dose des Abrins = 0,001 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge des Wasserstoff-superoxyds	Einwirkungsdauer des $H_2O_2$ auf Abrin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	50fache	0,5 ccm.	24 St.	385 g	402 g	Am Leben.
2	50 „	1 „	24 „	375 „	400 „	„ „
3	100 „	1 „	24 „	365 „	—	Am 2. Tage gestorben.
4	100 „	0,5 „	4 St. 30 Min.	365 „	295 g	Ist am Leben geblieben.
5	100 „	1 „	24 St.	470 „	495 „	Gesund geworden.
6	100 „	0,5 „	24 „	440 „	465 „	„ „
7	200 „	1 „	24 „	415 „	—	Am 2. Tage gestorben.
8	500 „	1 „	24 „	395 „	315 g	„ 4. „ „
9	500 „	1 „	3 × 24 St.	435 „	340 „	„ 8. „ „
10	1000 „	1 „	4 × 24 „	285 „	330 „	Ohne Reaction am Leben geblieben.
11	2000 „	0,5 „	24 St. 30 Min.	450 „	—	Am 2. Tage gestorben.

Tabelle V.

Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf Tetanotoxin.

Tödliche Dose des verwendeten Tetanotoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge des Wasserstoff-superoxyds	Einwirkungsdauer des $H_2O_2$ auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	0,5 ccm.	24 St.	385 g	430 g	Am Leben geblieben.
2	20 „	0,5 „	24 „	465 „	495 „	„ „ „
3	100 „	0,5 „	3 × 24 St.	525 „	595 „	„ „ „
4	100 „	0,5 „	24 St.	370 „	450 „	„ „ „
5	200 „	0,5 „	3 × 24 St.	380 „	460 „	„ „ „
6	400 „	0,5 „	24 St.	370 „	460 „	„ „ „
7	600 „	0,5 „	24 „	360 „	300 „	Gestorben.
8	1000 „	0,5 „	24 „	380 g	—	Gestorben am 2. Tage.
9	10 „	0,5 „	15 Min.	430 „	450 g	Am Leben geblieben.
10	20 „	0,5 „	15 „	555 „	600 „	„ „ „

Tabelle VI.

Einwirkung des Wasserstoffsuperoxyds auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge des Wasser- stoff- super- oxyds	Ein- wirkungs- dauer des $H_2O_2$ auf Diphtherie- toxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 8 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	0,5 ccm.	24 St.	355 g	370 g	Gesund.
2	20 „	0,5 „	24 „	370 „	410 „	„
3	100 „	1 „	2 × 24 St.	400 „	430 „	Infiltrat. Gesund.
4	100 „	0,5 „	24 St.	395 „	420 „	Gesund.
5	200 „	0,5 „	24 „	430 „	450 „	„
6	400 „	1 „	24 „	450 „	470 „	Infiltrat. Gesund.
7	400 „	0,5 „	24 „	480 „	500 „	Gesund.
8	600 „	0,5 „	24 „	360 „	395 „	Infiltrat. Gesund.
9	10 „	0,5 „	15 Min.	615 „	660 „	Gesund.
10	20 „	0,5 „	15 „	595 „	640 „	„

#### Versuche mit den Oxydasen.

Um wirksame Oxydasen aus der Milz, Parotis und Fibrin zu bekommen, bin ich nach mehrfachen Versuchen bei folgendem Verfahren stehen geblieben:

Fein zerkleinertes Organ resp. Fibrin wird nach Abe-  
lous und Biarnès mit dem 5- bis 10fachen Gewichte 8%iger  
Kalisalpeterlösung 1 bis 2 Tage unter Zusatz von Chloroform,

um die Fäulniss zu verhüten, stehen gelassen. Hierauf wird die Lösung von den Gewebsresten durch ein Tuch filtrirt und in das Filtrat  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  bis zu einem Gehalte von 50% eingetragen; es entsteht ein voluminöser Niederschlag, welcher abfiltrirt und direkt in einem Pergamentschlauch gegen fließendes Wasser so lange dialysirt wird, bis im Schlauchinhalt kein Ammonsulfat mehr vorhanden ist. Da dieses Auswaschen 3 bis 4 Tage dauert, so ist es zweckmässig, dem Schlauchinhalt einige Stückchen Thymol zuzusetzen. Bei geringster Fäulniss ist die Einwirkung der Oxydasen auf Guajactinctur und auch die entgiftende Wirkung auf die Toxine vernichtet. Werden solche, gewöhnlich übel-süsslich riechende Lösungen mit etwas Wasserstoffsuperoxyd versetzt, so wird zwar die Guajactinctur dadurch intensiv gebläut, eine Entgiftung der Toxine findet aber nicht statt. Es folgt daraus, dass die entgiftende Wirkung den sogenannten indirekten Oxydasen oder nach G. Linossier<sup>1)</sup> Peroxydasen nicht zukommt.

Der salzfrei ausgewaschene Schlauchniederschlag enthält den grössten Theil der Oxydase und in der Lösung ist nur wenig davon enthalten. Bei meinen Versuchen erwies es sich als das Zweckmässigste, diesen Niederschlag mit 0,85%iger  $\text{ClNa}$  zu einer Emulsion zu verreiben und nach Zusatz der Toxinlösungen bei der Bruttemperatur auf die letzteren einwirken zu lassen. Man kann auch die salzfreie Oxydase abfiltriren, mit Alkohol und Aether nachwaschen und im Vacuum über  $\text{SO}_4\text{H}_2$  trocken aufbewahren. Die Wirkung solcher getrockneten Präparate ist etwas schwächer. Bei meinen Versuchen über die entgiftende Wirkung der Oxydasen benutzte ich meistens den durch die Dialyse salzfrei ausgewaschenen Schlauchinhalt. Der flockige Niederschlag wurde in der Schlauchflüssigkeit zu einer Emulsion fein zerrieben und 0,5 bis 5 ccm. dieser Emulsion mit den Toxinlösungen

---

1) G. Linossier, Comp. rend. de la Société de Biologie, 1898, Seite 372.

von bekanntem Giftgehalte vermischt. Der Gehalt an festem Rückstand in solcher Emulsion schwankt natürlich je nach dem Material, aus welchem sie bereitet wurde, innerhalb ziemlich weiter Grenzen. Die Emulsionen aus der Milz z. B. enthalten mehr feste Stoffe als wie die aus dem Fibrin. Ich fand in meinen Emulsionen den Procentgehalt an festem Rückstand zwischen 0,03% bis 0,1%. Wie viel darin Oxydase und wie viel indifferente beigemengte Eiweissstoffe sind, das entzieht sich vorläufig jeder genaueren Bestimmung. Die Bläuung der Guajactinctur durch diese Emulsionen aus thierischem Material, wie Milz, Parotis oder Fibrin, war ziemlich gleich und bedeutend schwächer als wie durch die pflanzlichen Oxydasen, durch welche *ceteris paribus* die Guajactinctur intensiv blau gefärbt wird.

Aus dem oben Gesagten geht hervor, dass ich nur mit in Salpeterlösungen löslichen thierischen Globulinoxydasen, nicht aber mit den wasserlöslichen Oxydasen experimentirte. Wahrscheinlich wirken auch die wasserlöslichen thierischen Oxydasen auf die Toxine gleich wie die in Salpeter löslichen; wenigstens wurden durch die einzige wasserlösliche pflanzliche Oxydase aus der Scorzenerawurzel, mit der ich experimentirte, die Toxine ebenfalls entgiftet. Die Gemische der Oxydaseemulsionen mit den Toxinlösungen liess ich, bevor ich sie den Thieren injicirte, vorerst 15 Minuten bis 24 Stunden im Thermostaten stehen. Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, wird durch die Oxydasen relativ am energischsten das Diphtherietoxin entgiftet, indem 1 ccm. der Oxydaseemulsion die 600—800fach, nicht aber die 1000fach tödtliche Dose unwirksam macht. Schon schwächer ist die Wirkung auf das Tetanotoxin, indem 1 ccm. der Emulsion höchstens die Wirkung der 200fach tödtlichen Dose paralsirt. Auf Abrin erwiesen sich die von mir untersuchten Oxydasen als sehr wenig wirksam, indem 1 ccm. der Oxydaseemulsion nicht mehr als die einfach tödtliche Dose entgiftete. Uebrigens lasse ich jetzt die 3 Tabellen folgen, aus welchen das Resultat ersichtlich ist.

Tabelle VII.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbsmilz auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge der Oxy- dase	Ein- wirkungs- dauer der Oxydase auf Diphtherie- toxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 8 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	5 ccm.	24 St.	410 g	480 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	10 „	2 „	24 „	420 „	470 „	
3	20 „	5 „	24 „	345 „	400 „	
4	20 „	2 „	24 „	220 „	245 „	
5	20 „	1 „	24 „	375 „	—	
6	100 „	5 „	24 „	265 „	290 „	
7	100 „	2 „	24 „	430 „	455 „	
8	100 „	1 „	24 „	480 „	505 „	
9	200 „	1 „	24 „	265 „	290 „	
10	400 „	1 „	24 „	305 „	325 „	
11	500 „	1 „	24 „	400 „	415 „	
12	600 „	1 „	24 „	350 „	380 „	
13	1000 „	1 „	24 „	350 „	—	
14	10 „	2 „	15 Min.	308 „	325 „	
15	10 „	2 „	30 „	265 „	300 „	
16	10 „	2 „	1 St.	315 „	345 „	
17	20 „	2 „	2 „	295 „	330 „	
18	20 „	2 „	5 „	400 „	420 „	

Einwirkung der Oxydase aus Parotis vom Hunde auf  
Diphtherietoxin.

1	20fache	2 ccm.	24 St.	380 g	440 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 „	1 „	24 „	245 „	290 „	
3	50 „	0,5 „	24 „	330 „	385 „	
4	60 „	1 „	24 „	410 „	460 „	
5	100 „	1 „	24 „	370 „	405 „	
6	200 „	1 „	24 „	350 „	390 „	
7	400 „	1 „	24 „	285 „	315 „	
8	10 „	1 „	15 Min.	250 „	280 „	
9	20 „	1 „	30 „	285 „	320 „	

Tabelle VIII.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbsfibrin auf Diphtherietoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Diphtherietoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge der Oxy- dase	Ein- wirkungs- dauer der Oxydase auf Diphtherie- toxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	2 ccm.	15 Min.	375 g	390 g	Alle Thiere gesund.
2	20 „	2 „	30 „	408 „	448 „	
3	100 „	2 „	4 St.	386 „	420 „	
4	200 „	2 „	24 „	353 „	390 „	
5	400 „	2 „	24 „	348 „	389 „	
6	600 „	2 „	24 „	359 „	390 „	
7	800 „	2 „	24 „	388 „	405 „	

Einwirkung der Oxydase aus dem Fibrin von gegen Diphtherie  
hochimmunem Pferde auf Diphtherietoxin.

Das Serum dieses Pferdes enthielt 250 Heileinheiten  
in einem Cubikcentimeter.

1	10fache	1 ccm.	15 Min.	250 g	280 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 „	1 „	30 „	285 „	325 „	
3	100 „	1 „	5 St.	275 „	310 „	
4	200 „	1 „	24 „	305 „	360 „	
5	400 „	1 „	24 „	310 „	330 „	
6	600 „	1 „	24 „	350 „	370 „	

Einwirkung der im Vacuum während 2 Monaten aufbewahrten  
Oxydase auf Diphtherietoxin.

0,65 g in 65 ccm. physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

1	10fache	2 ccm.	24 St.	410 g	440 g	Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 „	2 „	24 „	350 „	392 „	
3	100 „	2 „	24 „	385 „	435 „	
4	200 „	2 „	24 „	364 „	390 „	

Einwirkung der gekochten Oxydase aus Kalbsmilz auf  
Diphtherietoxin.

1	20fache	2 ccm.	24 St.	350 g	—	Tod am nächsten Tage.
2	10 „	2 „	24 „	285 „	—	„ „ 2. Tage.
3	2 „	2 „	24 „	300 „	—	„ „ 2. „

Tabelle IX.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbsmilz auf Tetanotoxin.  
Tödliche Dose des verwendeten Tetanotoxins = 0,005 ccm.

	Zahl der injicirten einfach tödlichen Gilt Dosen	Menge der Oxy- dase	Ein- wirkungs- dauer der Oxydase auf Diphtherie- toxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	2 ccm.	24 St.	425 g	450 g	} Nach 30 Tagen alle Thiere gesund.
2	20 „	2 „	24 „	328 „	360 „	
3	20 „	2 „	24 „	335 „	380 „	
4	100 „	5 „	24 „	430 „	460 „	
5	100 „	5 „	24 „	520 „	550 „	
6	200 „	5 „	24 „	485 „	525 „	

Einwirkung der gekochten Oxydase aus Kalbsmilz auf  
Tetanotoxin.

1	20fache	2 ccm.	24 St.	450 g	—	Tod am nächsten Tage.
2	10 „	5 „	24 „	550 „	—	Tod am zweiten Tage.

Einwirkung der im Vacuum während 2 Monaten aufbewahrten  
Oxydase auf Tetanotoxin.

0,65 g in 65 ccm. physiologischer Kochsalzlösung aufgelöst.

1	10fache	2 ccm.	24 St.	310 g	380 g	} Tod.
2	20 „	2 „	24 „	390 „	450 „	
3	100 „	2 „	24 „	350 „	—	

Einwirkung der Oxydase aus Hundeparotis auf Tetanotoxin.

1	2fache	0,1 ccm.	21 St.	465 g	495 g	} Alle Thiere gesund.
2	2 „	0,5 „	21 „	370 „	398 „	
3	4 „	0,1 „	21 „	350 „	—	
4	10 „	0,5 „	21 „	380 „	425 „	
5	20 „	1 „	21 „	460 „	490 „	
6	100 „	0,5 „	21 „	490 „	500 „	Schwacher Totem, nachher gesund.
7	100 „	0,5 „	48 „	465 „	480 „	„ „ „ „
8	100 „	1 „	21 „	290 „	330 „	gesund geblieben.

Einwirkung der Oxydase aus Kalbsfibrin auf Tetanotoxin.

1	10fache	2 ccm.	24 St.	450 g	490 g	} Alle Thiere gesund.
2	20 „	2 „	24 „	375 „	430 „	
3	100 „	2 „	24 „	320 „	460 „	

**Einwirkung der Oxydase aus dem Fibrin von gegen Diphtherie hochimmunen Pferden auf Tetanotoxin.**

	Zahl der injicirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxydase	Einwirkungsdauer der Oxydase auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meer-schweinchens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
1	10 fache	2 ccm.	24 St.	395 g	435 g	} Alle Thiere gesund.
2	20 „	2 „	24 „	595 „	650 „	
3	100 „	2 „	24 „	640 „	680 „	
4	200 „	2 „	24 „	600 „	620 „	

Wie aus den Tabellen Nr. 8 und 9 ersichtlich ist, hat das Fibrin aus dem Blute des gegen Diphtherie immunisirten Pferdes eine Emulsion gegeben, wovon 2 ccm. die 200fach tödtliche Tetanotoxindose und 1 ccm. die 600fach tödtliche Dose des Diphtherietoxins entgiftete. Das Meerschweinchen, das ein Gemisch von 1 ccm. Emulsion mit der 1000fachen Diphtherietoxindose erhielt, ist dagegen an Diphtherie gestorben. Dass die entgiftende Wirkung dieser Oxydase nicht etwa davon herührt, dass das Fibrin mechanisch das Antitoxin mitgerissen habe, geht schon daraus hervor, dass es auch das Tetanotoxin, wenn auch etwas schwächer, entgiftet. Ich habe ferner gesehen, dass proportional der Immunisation auch die Menge der Oxydase zunimmt. Oxydase aus dem Fibrin eines Pferdes, das nur 80 Antitoxineinheiten in seinem Serum hatte, bläute Guajactinctur nur ganz schwach, schon stärker war die Bläuung durch die Oxydase eines Pferdes mit 120 Antitoxineinheiten. Am intensivsten aber bläute die Oxydase des Pferdes mit 250 Antitoxineinheiten. Bis jetzt habe ich meine Beobachtungen an 4 immunsirten und 2 normalen Pferden angestellt. Weitere Versuche werden zeigen, ob diese Proportionalität eine wirklich constante ist. Eine zweite, auffällige Erscheinung, welche das Fibrin gegen Diphtherie immuner Pferde im Vergleich zu dem der normalen zeigt, ist folgende: Wird das Fibrin durch spontane Gerinnung des farblosen Plasmas gewonnen, von dem anhängenden Serum abgepresst, mit Wasser aus-



gewaschen und sodann mit 8%igem Kalisalpeter unter Zusatz von Chloroform 24 Stunden im Thermostaten stehen gelassen, so geht ein Theil des Fibrins in Lösung über und zwar enthält bei immunen Pferden der gelöste Theil die Oxydase. Wird nun die filtrirte Lösung mit dem doppelten Volumen 96%igen Alkohols versetzt, so bildet sich bei normalen Pferden eine Trübung, die erst nach 10—20 Minuten sich flockig, wie geronnenes Eiweiss, zusammenballt und zu Boden setzt. Versetzt man dagegen *ceteris paribus* die Lösung von immunen Pferden mit dem doppelten Volumen 96%igen Alkohols, so entstehen schon in den ersten Minuten nach dem Vermischen längere Schleimfäden, die sich in kürzester Zeit zusammenballen und am Boden setzen. Die Erscheinung erinnert an das Ausfällen von Mucin aus Schleimflüssigkeiten durch Alkohol und ist so auffallend im Vergleich zu dem Verhalten der Extracte von normalen Pferden, dass sie sicher auf einer chemischen Verschiedenheit der aus dem Fibrin entstandenen Substanzen beruht. Je höher das Pferd immunisirt ist, um so mehr geht von dem Fibrin in die Salpeterlösung über und um so prägnanter ist die Erscheinung nach Alkoholzusatz. Während der durch Alkohol erzeugte und abfiltrirte Niederschlag aus dem Blute normaler Pferde durch Guajactinctur nicht gebläut wird, bläut dieser Niederschlag aus dem Blute immuner Pferde die Guajactinctur um so intensiver, je immuner das Pferd gegen die Diphtherie ist.

Dieser auffällige Unterschied in dem Verhalten des Fibrins diphtherieimmuner Pferde fordert auf zu vergleichenden Untersuchungen des Fibrins gegen andere Infectiouskrankheiten immunisirter Thiere und eröffnet den Weg zur experimentellen Erforschung der chemischen Vorgänge bei der Immunisation. Meine bisherigen Beobachtungen sind wenig zahlreich, um noch weitere Schlüsse zu ziehen, aber ich setze meine Untersuchung nach dieser Richtung weiter fort und hoffe bald noch mehr interessante Aufklärungen über die Immunität zu ermitteln. Ich benutze hier die Gelegenheit, Herrn Dr. Dzierzowski, dem ich das Blut der gegen Diphtherie in verschiedenen Stadien immunisirten Thiere verdanke, meinen besten Dank dafür auszusprechen.

Von grossem Werthe wird auch die Ermittlung der Thatsache sein, in welcher Beziehung die Oxydase zu den Antikörpern steht, denn schon die Thatsache, dass das Blut der immunisirten Pferde Oxydase enthält, das der normalen aber nicht, deutet auf eine gewisse Beziehung dieser beiden Substanzen zu einander.

#### **Pflanzliche Oxydase.**

Ausser den genannten thierischen Oxydasen habe ich auch eine pflanzliche, von mir aus der Schwarzwurzel (*Scorzonera hispanica*) dargestellte Oxydase auf ihre Wirkung gegen die Toxine untersucht.

Bekanntlich hat G. Bertrand<sup>1)</sup> und schon vor ihm der Japaner Hikorokuro Joschida in der Rinde der im süd-östlichen Asien einheimischen *Rhus*-Arten eine stark oxydirende Substanz gefunden. Die späteren umfangreichen Untersuchungen von G. Bertrand, zum Theil mit Bourquelot<sup>2)</sup> ausgeführt, ergaben, dass die Oxydasen mehr oder weniger in allen Pflanzen und in verschiedenen Theilen derselben — in Wurzeln, Knollen, Früchten, chlorophyllhaltigen Theilen derselben und in vielen Pilzen — vorkommen. G. Bertrand benannte diese Oxydasen mit dem Namen «Laccase». Im Gegensatz zu den thierischen Oxydasen wirken die pflanzlichen auch bei saurer Reaction. Es war nun interessant, zu ermitteln, wie sich die pflanzlichen Oxydasen gegen die von mir untersuchten Toxine verhalten werden. Da ich schon früher die Beobachtung machte, dass der wässrige Auszug der Schwarzwurzel Guajactinctur stark bläuet, so habe ich mit der darin enthaltenen Oxydase meine Versuche angestellt. Die frisch vom Markte geholte Schwarzwurzel wurde oberflächlich mit dem Messer durch Abschaben gereinigt, sodann klein zerschnitten, mit chloroformhaltigem Wasser übergossen und 24 Stunden lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Der durch Tuch colirte wässrige Auszug, welcher die Guajactinctur intensiv bläute, wurde mit pulverigem Ammoniumsulfat

---

1) G. Bertrand, Comp. rend., 1895, S. 226.

2) G. Bertrand und E. Bourquelot, Comp. rend., 1895, S. 783.

übersättigt, der entstandene flockige Niederschlag abfiltrirt und vom Ammonsulfat durch Dialyse befreit. Um die so erhaltene Oxydase, die stark Guajactinctur bläute, zu reinigen, wurde sie von Neuem in Wasser gelöst, aus der Lösung durch Ammonsulfat ausgefällt und durch Dialyse von dem letzteren befreit. Das so erhaltene Produkt war etwas grau gefärbt und gab alle für die Oxydasen charakteristischen Reactionen. Kurzes Aufkochen genügte, um diese oxydirende Wirkung zu zerstören. Da die so isolirte Oxydase zur vollkommenen Auflösung ziemlich viel Wasser brauchte, so habe ich auch hier nach beendeter Dialyse den flockigen Niederschlag in der Schlauchflüssigkeit fein zerrieben, vermischte die entstandene Emulsion mit den Toxinlösungen von bekanntem Giftwerthe und liess, wie mit thierischen Oxydasen, die Gemische 24 Stunden im Thermostaten stehen. Wie aus der nachfolgenden Tabelle ersichtlich, wirkt diese Oxydase auf das Abrin nicht ein. Dagegen wurden durch 2 ccm. der Emulsion die 100fach tödtlichen Dosen von Diphtherie- und Tetanotoxin entgiftet.

Tabelle X.

Einwirkung der Oxydase aus der Schwarzwurzel auf Abrin.  
Tödtliche Dose = 0,001 ccm.

	Zahl der injectirten einfach tödtlichen Giftdosen	Menge der Oxy- dase	Ein- wirkungs- dauer der Oxydase auf Toxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Tage nach der Injection	Bemerkungen
1	10fache	2 ccm.	24 Std.	360 g	350 g	Am 6. Tage tod.
2	50 „	2 „	24 „	370 „	350 „	„ 3. „ „
3	100 „	2 „	24 „	350 „	332 „	„ 8. „ „
4	500 „	2 „	24 „	350 „	—	Tod in der Nacht.

Auf Tetanotoxin (tödtliche Dose = 0,005 ccm.)

5	10fache	2 ccm.	24 Std.	400 g	440 g	Infiltrate an den In- jectionstellen, sonst gesund.
6	20 „	2 „	24 „	380 „	410 „	
7	100 „	2 „	24 „	490 „	535 „	

Auf Diphtherietoxin (tödliche Dose = 0,005 ccm.)

	Zahl der injicirten einfach tödlichen Giftdosen	Menge der Oxy- dase	Ein- wirkungs- dauer der Oxydase auf Tetanotoxin vor der Injection	Gewicht des Meer- schwein- chens vor der Injection	Gewicht des Thieres 2 Wochen nach der Injection	Bemerkungen
8	10fache	2 ccm.	24 Std.	295 g	235 g	Infiltrate an den In- jectionsstellen, sonst gesund.
9	20 „	2 „	24 „	400 „	415 „	
10	100 „	2 „	24 „	356 „	370 „	

Schlussfolgerungen.

1. Das Calcium- und Wasserstoffsuperoxyd wirken auf die Toxine der Diphtherie, des Tetanus und das Abrin entgiftend. Die gleiche Wirkung haben die thierischen, sowie die pflanzlichen Oxydasen auf die zwei ersten Toxine, nicht aber auf das Abrin.

2. Die entgiftende Wirkung der Oxydasen geschieht nicht nur in vitro, sondern auch im Thierkörper selbst bei gleichzeitiger Einspritzung einerseits der Toxine, andererseits der Oxydasen in verschiedene Körperstellen.

3. Aus dem Fibrin normaler Pferde wird keine Oxydase mittelst Kalisalpeter extrahirt, wohl aber aus dem Fibrin gegen die Diphtherie immunisirter Pferde.

4. Die Entgiftung der Toxine durch Oxydasen findet nur dann statt, wenn die letzteren die Guajactinctur direkt bläuen. Extracte, welche auf Guajactinctur nicht mehr wirksam sind, sind ohne Wirkung auf die Toxine.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Nencki für seine Unterstützung mit Rath und That bei diesen Untersuchungen meinen herzlichen Dank auszusprechen.

# **Ueber die Bildung des Leucinimids bei der peptischen und tryptischen Verdauung des Oxyhämoglobins resp. des Globins.**

Von  
**S. Salaskin.**

---

(Aus dem chemischen Laboratorium des Instituts für experimentelle Medicin in  
St. Petersburg.)

(Der Redaction zugegangen am 29. Mai 1901.)

---

Anlässlich meiner noch nicht abgeschlossenen Untersuchungen über die Spaltungsprodukte des Hämoglobins resp. des Globins bei der peptischen und tryptischen Verdauung habe ich eine bis jetzt als Produkt der Eiweissverdauung unbekannte krystallinische Substanz aufgefunden, die sich bei näherer Untersuchung als Leucinimid herausstellte.

Das Verfahren, wobei ich das Leucinimid aufgefunden habe, war folgendes: krystallinisches Oxyhämoglobin, das auf die übliche Weise aus den Blutkörperchen des Pferdeblutes erhalten war, wurde bei 38° C. mit Magensaft, der von Hunden nach der Pawlow'schen Methode erhalten war, verdaut. Die angewandte Menge des Magensaftes war dem Gewichte nach 10—20 Mal grösser als die des Oxyhämoglobins. Der Magensaft wurde nicht auf einmal, sondern in kleinen Portionen in Zwischenräumen von 3—5 Tagen hinzugefügt. Die Verdauungsdauer schwankte zwischen 8—30 Tagen, dabei wurde gewöhnlich nach 2—3 Tagen die Verdauungsmischung von dem gefällten Hämatin abfiltrirt und das gelbgefärbte Filtrat der weiteren Verdauung unterworfen. Um die Fäulniss zu verhüten, setzte ich der Flüssigkeit etwas Chloroform und Aether hinzu.

Nach beendeter Verdauung wurde die Flüssigkeit mit Soda neutralisirt, mit Essigsäure schwach angesäuert und auf

dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz eingedampft. Die syropöse Lösung wurde nach dem Erkalten von dem, meistens in geringer Menge entstandenen, Niederschlage abfiltrirt und das Filtrat mit dem mehrfachen Volumen Alkohol übergossen. Nach 24 Stunden ist ein klebriger, an den Wänden des Glases fest haftender Niederschlag entstanden, von welchem die klare Flüssigkeit leicht abgegossen werden konnte. Die filtrirte, gelbliche alkoholische Lösung wurde auf dem Wasserbade von Neuem bis zur Syrupconsistenz eingedampft und wiederum mit dem 5—6fachen Volumen Alkohol übergossen, der dabei entstandene Niederschlag wurde abfiltrirt und das Filtrat jetzt zur Trockne eingedampft. Der trocken Rückstand wurde wiederholt mit absolutem Alkohol ausgekocht, die abfiltrirte, heisse, alkoholische Lösung stehen gelassen, wobei sich nach dem Erkalten ein Niederschlag bildete, der abfiltrirt und das Filtrat auf dem Wasserbade bis zur Syrupconsistenz eingedampft wurde. Aus dem jetzt erhaltenen Syrup können die Krystalle des Leucinimids nach den zwei folgenden Methoden isolirt werden:

1. Zu dem noch heissen Syrup wird Wasser hinzugefügt, wobei sogleich ein krystallinischer, öfters aber nur amorpher Niederschlag entsteht. Wird er indessen mit Wasser gekocht, so ist der beim Erkalten entstandene Niederschlag stets krystallinisch. Die Ausbeute an Krystallen ist aber gering, da ein erheblicher Theil der Substanz in der Lösung bleibt.

2. Der Syrup wird wiederholt mit Essigäther extrahirt. Die ätherischen Auszüge zur Trockne verdunstet, der Rückstand in heissem Wasser gelöst und bis zur beginnenden Krystallisation eingedampft oder der Rückstand wird in wenig heissem Alkohol gelöst, zu der filtrirten und auf dem Wasserbade eingeengten Lösung etwa das doppelte Volumen Wasser hinzugefügt, worauf das Leucinimid krystallinisch ausfällt.

Bei der Verdauung mit dem nach Pawlow erhaltenen pankreatischen Saft wurde das Hämatin erst nach beendeter Verdauung entfernt, weil dank der alkalischen Reaction, das Hämatin sich auflöste und erst nach dem Ansäuern mit Essigsäure ausfiel. Die davon abfiltrirte Flüssigkeit wurde ein-

gedämpft und dann mit Alkohol gefällt, der verdunstete alkoholische Auszug wurde mit Alkoholäther extrahirt, das Filtrat verdunstet und der Rückstand mit Essigäther extrahirt. Die ätherischen Auszüge wurden zur Trockne eingedampft. Nach Verdunsten des Essigäthers wurde der trockne Rückstand mit kaltem, absolutem Alkohol zerrieben, wobei das Leucinimid krystallinisch hinterblieb. Die Krystalle wurden aus heissem Alkohol unkrystallisirt und scheiden sich daraus beim Erkalten in atlasglänzenden Nadeln aus. Zweckmässig ist auch hier, die heisse alkoholische Lösung einzunengen und das Leucinimid durch Wasserezusatz auszufällen.

Bezüglich der Ausbeute und vortheilhaftesten Zeitdauer kann ich sowohl hinsichtlich der peptischen wie der tryptischen Verdauung keine bestimmten Angaben machen, zumal die Isolirung und Reindarstellung des Leucinimids mit grossen Verlusten verbunden ist. In einem Falle habe ich bei der Pepsinverdauung nach 30tägiger Dauer 0,3% vom Gewicht des angewandten Oxyhämoglobins erhalten. Die Isolirung des Leucinimids bei der Trypsinwirkung ist noch viel schwieriger; aus 100 g des Oxyhämoglobins habe ich nach 5tägiger Verdauung ca. 0,1 g des Leucinimids erhalten.

Die reinen Krystalle sind in Wasser bei Zimmertemperatur fast unlöslich, viel leichter in heissem, wenig löslich in Aether, viel leichter in Essigäther; am besten in siedendem 96%igen Alkohol, etwas weniger in absolutem. Die Löslichkeit der nicht völlig reinen Krystalle ist in allen oben erwähnten Lösungsmitteln eine viel grössere. Bemerken will ich, dass die bei der peptischen Verdauung erhaltenen Krystalle leichter löslich als die bei der tryptischen sind. In Säuren und Alkalien sind die Krystalle nicht mehr als wie in reinem Wasser löslich. Trocken erhitzt, sublimiren sie leicht unter Bildung voluminöser, aus verfilzten weissen Nadeln bestehenden Flocken.

Die Krystalle, die bei der tryptischen Verdauung gewonnen wurden, schmelzen nach dem Trocknen bei 295—296° C. Der Schmelzpunkt bleibt derselbe für verschiedene Fractionen, auch nach mehrfachem Umkrystallisiren aus heissem Alkohol.

Dagegen ist es mir nicht gelungen, bei der peptischen Verdauung ein Produkt von constantem Schmelzpunkt zu erhalten. Die erste Fraction der Krystalle, die durch Wasserzusatz zu der heissen concentrirten alkoholischen Lösung gewonnen wurde, schmolz bei  $250^{\circ}$  C. Diese Krystalle sind in kaltem, absolutem Alkohol leicht löslich und werden daraus durch Aether nicht gefällt. Eine zweite Fraction, die durch Zusatz von etwas Wasser zu dem alkoholischen Filtrate erhalten wurde, schmolz bei  $267^{\circ}$  C. Diese Krystalle sind in absolutem Alkohol in der Siedehitze nur wenig löslich, und beim Erkalten bildete sich nur ein minimaler Bodensatz. Durch Aether werden sie aus der alkoholischen Lösung gefällt. Der Schmelzpunkt der mit Aether gefällten und im Vacuo getrockneten Krystalle lag bei  $273$ — $274^{\circ}$  C. Die Krystalle der bis zur Trockne eingedampften Mutterlauge schmolzen bei  $253^{\circ}$  C.

Die Elementaranalyse der bei der peptischen Verdauung und an der Luft bis zu constantem Gewichte getrockneten Krystalle (bei  $105^{\circ}$  C. verloren sie nichts an Gewicht) gab folgende Resultate:

0,1990 g Substanz: 0,4650  $\text{CO}_2$ , 0,1680  $\text{H}_2\text{O}$ ,  
 0,2102 „ „ 22,6 ccm. N ( $18^{\circ}$  C. und 755,2 mm.).  
 Für  $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}$  berechnet: C 63,83, H 9,73, N 12,39.  
 Gefunden: „ 63,72, „ 9,38, „ 12,39.

Aus Mangel an Material konnte ich die Analyse der bei der tryptischen Verdauung gewonnenen Krystalle nicht ausführen. Das äussere Aussehen und die Eigenschaften dieser Krystalle waren dieselben wie die von der peptischen Verdauung; sie unterschieden sich von denselben nur durch die Löslichkeit und höheren Schmelzpunkt.

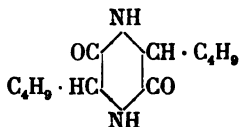
Um das bei der peptischen und pankreatischen Verdauung von mir erhaltene Produkt mit dem aus Leucin erhaltenen Leucinimid zu vergleichen, habe ich das letztere nach der Vorschrift von E. Fischer<sup>1)</sup> dargestellt. Der Schmelzpunkt des so gewonnenen Präparates lag bei  $269$ — $270^{\circ}$  C. und in allen übrigen Eigenschaften war das bei der peptischen

1) Ber. d. dtsh. chem. Ges. **36**, 448, 1901.



Verdauung erhaltene Leucinimid mit dem aus Leucin erhaltenen identisch.

Leucinimid als Spaltungsprodukt bei der hydrolytischen Zersetzung der Eiweissstoffe ist schon durch die Untersuchungen früherer Forscher als sogenannte Bopp'sche Substanz bekannt. In jüngster Zeit (1897) beschrieb Cohn<sup>1)</sup> einen von ihm als Pyridinderivat von der Zusammensetzung  $C_6H_7NO$  aufgefassten Körper, den er bei der Spaltung des Caseins mit kochender Salzsäure isolirt hatte. Kurz darauf machte Ritthausen<sup>2)</sup> auf die grosse Aehnlichkeit dieses Pyridinderivates mit dem Leucinimide aufmerksam. Cohn<sup>3)</sup> verglich darauf sein Pyridinderivat mit dem von Ritthausen bei der hydrolytischen Spaltung der Eiweissstoffe erhaltenen, sowie mit dem aus Leucin synthetisch dargestellten Leucinimid und kam zu der Ueberzeugung, dass alle diese Körper als identisch resp. isomer anzusehen seien, bemerkte aber, dass seine Substanz von den Krystallen des aus Leucin erhaltenen Leucinimids sich durch den um  $33^\circ$  höheren Schmelzpunkt, leichtere Löslichkeit in Alkohol und leichtere Löslichkeit in Aether unterscheidet.<sup>4)</sup> Der Cohn'sche Körper schmolz bei  $295-296^\circ C.$ ; das synthetisch dargestellte Leucinimid bei  $262^\circ C.$  Ferner kam Cohn<sup>5)</sup> auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schlusse, dass das Leucinimid eine cyklische Verbindung, ein Dibutyldiacipiperazin



sei und dass die empirische Formel des Leucinimids  $C_6H_{11}NO$  verdoppelt werden muss.

E. Fischer<sup>6)</sup> fand den Schmelzpunkt für 3,6 Diisobutyl,

1) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXII, S. 153, 1897.

2) Ber. d. dtsh. chem. Ges., 29, 2109, 1897.

3) Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXIX, S. 283, 1900.

4) l. c. 286.

5) l. c. 299.

6) Ber. d. dtsh. chem. Ges., 34, 448, 450, 1901.

2,5 Diacipiperazin 271° C. (corr.), für 3,6 Dibutyl, 2,5 Diacipiperazin 268° C. (corr.).

Das von mir bei der tryptischen Verdauung isolirte Leucinimid schmilzt bei 295—296° C. und ist in jeder Hinsicht mit dem von Cohn erhaltenen Körper identisch. Das bei der tryptischen Verdauung erhaltene, sowie das Cohn'sche Leucinimid können daher mit den von E. Fischer untersuchten Leucinimiden nur isomer sein.

Was nun das bei der peptischen Verdauung entstandene Leucinimid betrifft, so ist es mir zwar nicht gelungen, ein Produkt von constantem Schmelzpunkt zu isoliren, doch näherte er sich in einigen Fractionen dem Schmelzpunkte des synthetischen Leucinimids. Vermuthlich hängt der niedrigere Schmelzpunkt dieses Leucinimids von einer geringen Beimischung eines isomeren ab, von welchem bei der geringen Menge des erhaltenen Materials ich die Hauptmenge durch öftere Krystallisation nicht befreien konnte.

Das Ergebniss meiner bisherigen Versuche zeigt, dass:

1. bei der protrahirten peptischen Verdauung auch krystalloide Produkte entstehen, was schon von Hoppe-Seyler und vor Kurzem von Lawrow hervorgehoben wurde und 2., dass, je nachdem die Verdauung in peptischer oder tryptischer Lösung vor sich geht, isomere Leucinimide entstehen, die entgegen der Meinung von Cohn und Ritthausen nicht etwa weitere Umwandlungsprodukte des primär abgespaltenen Leucins, sondern aller Wahrscheinlichkeit nach schon im Globinmolekül präformirt sind. Weitere Versuche werden zeigen, ob auch aus anderen Eiweissstoffen bei der Magen- resp. Pankreasverdauung ebenfalls Leucinimide abgespalten werden.

---

---

**M. DuMont-Schauberg, Strassburg.**

---





